



ТАРТУСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
АКАДЕМИЯ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР
МИНЗДРАВ СССР

ГЕННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В РЕШЕНИИ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ БИОТЕХНОЛОГИИ

Том II



ТАРТУ 1989

**ТАРТУСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
АКАДЕМИЯ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР
МИНЗДРАВ СССР**

**ГЕННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ
В РЕШЕНИИ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ
ПРОБЛЕМ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Материалы всесоюзной конференции

Том II

Тарту-Кяэрику 20-22 сентября 1988 г.

ТАРТУ 1989

Оргкомитет и редколлегия: Б.Ф.Семенов (председатель)

А.-В.Н.Микельсаар (зам.председателя, ответственный редактор)

Р.Л.-Э.Виллемс (зам.председателя)

Л.С.Уускула (ответственный секретарь, редактор)

Т.О.Майметс

Д.И.Медведев

М.Г.Вийкмаа

А.О.Кюгер

А.О.Пийрсоо

А.Л.Хейнару

А.И.Лавинг

У.Э.Сутроп

Т.Э.Тальпсеп

Я.К.Хабихт

Р.В.Сикут

Ю.Я.Парик

KUSTUTATUD

Arh.

Tartu Ülikooli

Teadus- ja
Raamatukogu

10355

ГИБРИДОМЫ И МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА I

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ИХ РЕАЛИЗАЦИЯ

Н.Ф.Стародуб, Л.И.Коломиец, С.А.Бобровник, В.И.Назаренко

Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев

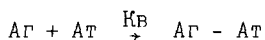
После открытия в 1960 г. радиоиммунного анализа (РИА) начался так называемый иммунохимический бум, который принес огромное количество оригинальных методов для тестирования различных биологически важных соединений и который уже перерастает в новую революционизирующую волну в диагностике - биосенсорную технологию, впитывающую лучшие достижения в области иммунохимии, иммобилизованных ферментов и биоэлектроники. Широко используемые в настоящее время в медицине, сельском хозяйстве и при мониторинге окружающей среды иммунохимические методы различаются по назначению и постановке, природе метки и ее регистрации, набору меченых компонентов и способу их разделения от продуктов реакции и т.д. Все это многообразие методических подходов может быть реализовано не только для разных антигенов (Аг), но и для одного из них в зависимости от поставленных условий и решения задач в каждом конкретном случае.

Выбор того или иного методического подхода главным образом определяется его специфичностью, чувствительностью, экспрессностью, надежностью, простотой и дешевизной. Все же чувствительность и специфичность являются основными параметрами анализа. Причем они тесно связаны между собой. Вместе с тем, если специфичность анализа обеспечивается за счет селективного взаимодействия антигенной детерминанты с антигенсвязывающим центром антител (Ат), то его чувствительность зависит от целого ряда самых разных факторов. Выяснение этих факторов и поиск эффективных путей их использования на практике приобре-

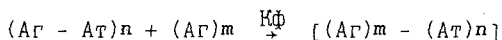
тает особую значимость при применении существующих иммунохимических методов и разработке нового поколения диагностикомов.

В настоящем сообщении приведены данные по изучению зависимости чувствительности твердофазного иммунохимического анализа от особенностей его постановки и иммобилизации компонентов на твердой фазе, вида метки и способа ее детекции, специфичности и аффинности Ат. Одновременно обсуждаются предложенные способы оценки аффинности Ат, а также пути повышения чувствительности анализа за счет направленного изменения других перечисленных выше факторов.

Взаимодействие Аг и Ат в зависимости от условий может быть двояким:



или



Моновалентное связывание представляет собой реакцию антигенной детерминанты с антигенсвязывающим центром. При поливалентном связывании в этом процессе участвуют несколько Ат, в той или иной степени реализуется функциональная активность двух и более их активных центров, либо одновременно проявляются обе возможности. В первом случае реакция характеризуется константой внутреннего сродства (K_B), величина которой может варьировать от 1×10^5 до $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$. Взаимодействие Ат с поливалентным Аг описывается рядом отдельных констант, характеризующих в суммарном виде функциональное сродство. Его константа (K_F) уже на три порядка больше предыдущей. Современные иммунохимические методы основываются на первичных реакциях образования комплекса Аг-Ат. Все же некоторые из них (типа "сэндвичных" вариантов) могут включать и поливалентное связывание. При этом они существенно различаются и по чувствительности анализа. Теоретически возможные ее пределы лимитируются величинами K_B и K_F .

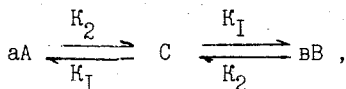
Джесон и Экинс [12] рассчитали, что зависимость чувствительности конкурентного РИА (σ) от аффинности используемого препарата Ат и уровня неспецифической реакции (сорбции) описывается следующим выражением: $\sigma = \frac{C_V R_O}{K}$, где $C_V R_O$ - уровень варьирования сигнала в контроле, а K - константа аф-

финности Ат. Такая же зависимость чувствительности от аффинности Ат сохраняется и для неконкурентного РИА. Ввиду этого, предпочтительнее использовать Ат, характеризующиеся высоким сродством или авидностью, т.е. с высоким значением K_b для отдельных антигенсвязывающих центров.

В связи с изложенным выше возникает необходимость контроля функциональной аффинности используемого препарата Ат для иммунохимического анализа. Предложенные ранее [8] классические методы определения данного показателя успешно применимы для гаптенон и не могут быть перенесены на высокомолекулярные и, особенно, корпускулярные Аг. В большинстве случаев они являются весьма трудоемкими. Поэтому предприняты попытки использовать для этих целей иммунохимический анализ. Так, Мюллер и соавт. [13] вывели эмпирическую формулу для вычисления величины K_f , исходя из результатов конкурентного РИА:

$$K_f = \frac{8}{3([I_t] - [T_t])} ,$$

где I_t и T_t - молярные концентрации ингибитора и иммобилизованного Аг, соответственно. Такой подход применим и для изучения функциональной аффинности Ат с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на платах при условии предварительного определения уровня иммобилизованного Аг в ячейках. С его помощью оценены K_f трех препаратов моноспецифических поликлональных Ат. Для кроличьих Ат к казеину коровы, альбумину сыворотки быка и крысиных антител к глобину кролика они достигают значений 8×10^8 , 1×10^9 и $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, соответственно. Однако метод Мюллера и соавт. [13], как и ряд других появившихся аналогичных методов [15, 16, 19] являются либо весьма эмпирическими, либо требуют точного определения концентрации Ат или Аг и не позволяют судить о таких кинетических параметрах, как константы ассоциации (K_1) и диссоциации (K_2). Указанные недостатки устраняются предложенным нами методом [1, 2], в основу которого положен принцип изучения процесса диссоциации предварительно образованного комплекса Аг-Ат в присутствии свободного Аг по следующей схеме:



где: а, в, С, А, В - количество иммобилизованного (а) и свободного (в) Аг, а также свободных Ат (С), связанных с иммобилизованным (А) и свободным Ат (В). Динамика рассматриваемого процесса описывается системой дифференциальных уравнений:

$$\frac{dA}{dt} = -K_2 A + K_1 aC$$

$$\frac{dB}{dt} = -K_2 B + K_1 bC$$

$$\frac{dC}{dt} = K_2 (A + B) - K_1 (a + b)C,$$

где t - время.

Их решение относительно K_I и K_2 и константы равновесия (K_p) позволяет получить следующие выражения:

$$K_2 = \frac{A_I - A_p/A_2 - A_p}{t_2 - t_1};$$

$$K_p = \frac{A_0/A_{p2} - A_0/A_{p1}}{v_2(A_0/A_{p1} - I) - v_1(A_0/A_{p2} - I)}; \quad K_I = K_2 K_p,$$

где A_0 , A_I , A_2 и A_p - исходные количества Ат, связанных с иммобилизованным антигеном через промежутки времени t_1 , t_2 и после достижения в системе равновесия, соответственно. Для вычисления Кф достаточно построить калибровочную кривую зависимости интенсивности реакции от разведения Ат, а также получить данные об уровне элюции Ат с иммобилизованного иммунного комплекса в присутствии Аг (рис. 1А). Дополнительное определение количества Ат (A_{p1} и A_{p2}), оставшихся в комплексе после элюирования их двумя разными (v_1 и v_2) количествами Аг, позволяет оценить величину Кф (рис. 1В).

Для указанных выше Ат к казеину получены значения K_I , K_2 и K_p равными $4,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $8,6 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, $5,6 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, соответственно. Таким же путем были определены аналогичные параметры и для мышиных Ат к *S. aureus*: $K_I - 8 \times 10^{5-6} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $K_2 - 9,3 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ и $K_p - 8,6 \times 10^{9-10} \text{ M}^{-1}$, полагая, что на одну бактериальную клетку приходится 10^{4-5} антигенных детерминант.

Обращает внимание, что методами, предложенными Мюллером и соавт. и предложенным нами, получены разные величины Кф и

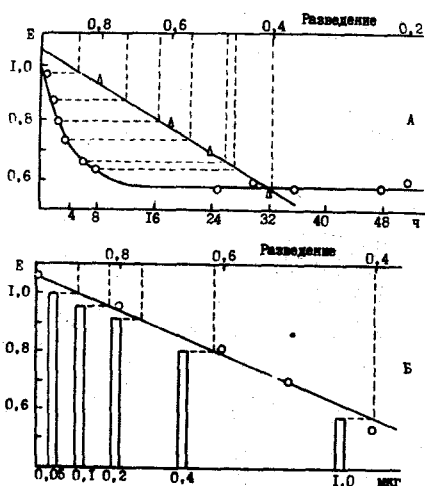


Рис. 1. Зависимость интенсивности иммуноферментной реакции от разведения антител (прямые линии). Кривая кинетики элюирования антител с иммобилизованного казеина в присутствии свободного гомологичного антигена (А) и значение A_p (столбики) (Б) при различных количествах свободного казеина.

K_D для Ат к казеину, что, видимо, связано с более точным их определением в последнем случае, так как нет необходимости учитывать концентрацию Аг, находящегося в составе иммунного комплекса. Однако следует иметь в виду, что пока все предложенные иммунохимические методы не учитывают возможные конформационные изменения сорбированного Аг, которые могут привести к погрешностям при определении значений кинетических констант реакции Аг-Ат. Чтобы их избежать необходимо рассматривать более сложную модель, включающую константы связывания Ат с сорбированным и свободным Аг.

Джексон и Экинс [12] пришли к выводу, что чувствительность неконкурентного РИА по сравнению с конкурентным может быть на 2 порядка выше согласно выражению:

$$\sigma = \frac{A \cdot CV_{nsb}}{K}$$

где: А - величина неспецифического сигнала, а CV_{nsb} - уровень варьирования сигнала в контроле. При значениях А, CV_{Ro} и CV_{nsb} равными 0,01 (т.е. отклонении в 1 %) и практически крайней величине K_D , составляющей 10^{12} M^{-1} , предельная чувствительность конкурентного и неконкурентного РИА будет дости-

10^{-14} и 10^{-16} М, соответственно. Снижение или повышение уровня неспецифического сигнала оказывает обратное влияние на общую чувствительность метода. Особенно в значительной мере это происходит при использовании компонентов иммунохимической реакции, содержащих метку, детекция которой осуществляется с разной чувствительностью. Приведенные ниже в таблице I данные о чувствительности некоторых иммунохимических методов подтверждают это положение. При этом обращает внимание, что колебания чувствительности анализа за счет применения разной метки (^{125}I , пероксидаза) на $1-2$ порядка больше, чем из-за различий в постановке. Потенциально можно достичь чувствительности равной 10^3 молекул в мл в случае обеспечения высокоэффективной регистрации меченых компонентов, как это имеет место при флуоресцентном иммунохимическом анализе.

Известно, что эффективность регистрации единичного радиоактивного распада и кванта света примерно одинаковая. Все же накопленные сведения по иодированию белков свидетельствуют о том, что без потери их свойств не удастся достичь большей удельной радиоактивности, чем 10^3 имп/с на 10^{-12} молей. Ввиду чего предельная чувствительность РИА может достигать только 10^{-16} молей. В хемилюминесцентном и флуоресцентном анализах вполне возможно обеспечить 10^7 фотонов/с на 10^{-12} молей, что позволяет повысить их чувствительность на 4 порядка. Существует два в какой-то мере альтернативных пути повышения чувствительности твердофазного анализа. Один из них заключается в применении люминесцентных или флуоресцентных меток, а второй - состоит в том, что регистрация ферментативной активности меченых компонентов осуществляется с помощью хемилюминесцентной или флуоресцентной реакции.

Нами [7] разработан вариант количественного ИФА способом дот с использованием нитроцеллюлозы в качестве твердой фазы и индикаторной хемилюминесцентной реакции на пероксидазу, позволяющей с высокой чувствительностью определять содержание растворимых и корпускулярных Аг. Следует отметить, что твердофазный ИФА способом дот несмотря на широкое распространение, даже в сочетании с одновременным дробным разведением исследуемого образца, является полуколичественным ввиду визуальной оценки результатов реакции. Попытки регистрации ин-

Чувствительность некоторых методов иммунохимического анализа

Таблица I

Метод	Метка	Объект анализа	Чувствительность	Источник
Дот				
1. Прямой неконкурентный	^{125}I	казеин	1×10^{-12} г (2×10^7 молекул)	[5,6]
2. Непрямой неконкурентный	"	казеин	4×10^{-11} г (8×10^8 ")	[4]
3. " "	пероксидаза	казеин	1×10^{-10} г (2×10^9 ")	[5,6]
4. " "	"	казеин	1×10^{-9} г (2×10^{10} ")	[4]
5. " "	"	трансферин	$1 \times 10^{-10-11}$ г ($6 \times 10^{7-8}$ ")	[10]
6. " "	"	VP 1 SV-40	- ($5 \times 10^{8-9}$ ")	[17]
Блот				
1. Непрямой неконкурентный	^{125}I	некоторые ферменты	1×10^{-11} г	[9]
2. " "	пероксидаза	белок вируса полиодроза	1×10^{-8} г	[14]
3. " "	"	казеин	1×10^{-7} г	[5,6]
Анализ на платах:				
1. Непрямой неконкурентный	^{125}I	гексокиназа дрожжей	$1 \times 10^{-9-10}$ г/0,1 мл или $5 \times 10^{7-8}$ молекул	[10]
2. Непрямой конкурентный	пероксидаза	казеин	$2-5 \times 10^{-9}$ г/0,1 мл или $4 \times 10^9-1 \times 10^{10}$ молекул	[5,6]

тенсивности окраски пятна иммобилизованного материала на твердой фазе оказались безуспешными из-за технической сложности решения данной задачи.

В качестве хемилюминесцентной реакции широко используется катализируемое пероксидазой окисление люминола пероксидом водорода. Интерес к этой реакции возрос после того, как была показана возможность усиления хемилюминесценции люциферинном и более доступным 4-иодфенолом [18].

Установлено, что максимальное отношение сигнал-фон наблюдается при pH 8,5 и концентрациях люминола, 4-иодфенола и пероксидазводорода соответственно равным 1×10^{-5} , 5×10^{-4} и 1×10^{-3} М. В этих условиях возможно определение фермента при концентрации 1×10^{-13} М. В случае регистрации активности пероксидазы в иммунном комплексе по цветному показателю способом дот можно обнаружить лишь 0,1-1 нг таких Аг, как IgG, казеин. При регистрации же активности фермента с помощью хемилюминесценции способом дот удастся надежно выявить даже 1 пг IgG, казеина, X-вируса картофеля в пробе. Причем количественное определение Аг в диапазоне 1 нг - 10 нг удобно вести с использованием градуировочных графиков, построенных в логарифмических координатах, когда зависимость интенсивности хемилюминесценции от их уровня на нитроцеллюлозе имеет прямолинейный характер (рис. 2). Следовательно с помощью индикаторной хемилюминесцентной реакции на пероксидазу, используемой в качестве метки для Аг, удастся не только добиться количественной оценки результатов, но и повысить на 2-3 порядка чувствительность ИФА при постановке способом дот.

В случае выявления Аг в исследуемой жидкости с помощью твердофазных иммунохимических методов важную роль играет этап их иммобилизации. Особенно это проявляется при постановке анализа на иммунологических платах. В настоящее время предложен ряд способов иммобилизации Аг, которые в основном сводятся к инкубации растворов в ячейках указанных выше плат. При этом иммобилизация достигается за счет спонтанной сорбции или в результате ковалентного связывания с поверхностью, предварительно обработанной различными химическими соединениями, включая и бифункциональные реагенты. Последний подход является довольно сложным, в то же время спонтанной сорбцией при

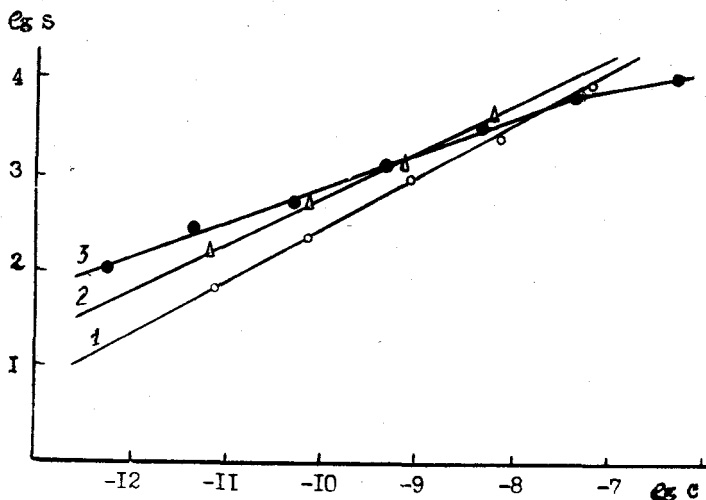


Рис. 2. Интенсивность иммунохемилуминесцентной реакции в зависимости от количеств IgG (1), казеина (2) и X-вируса картофеля (3), иммобилизованных в качестве антигенов.

По оси абсцисс - количество антигенов, г; по оси ординат - уровень свечения, фотон/с.

инкубации растворимых Аг не всегда удается достичь необходимой эффективности иммобилизации. В случае корпускулярных Аг она практически совсем отсутствует.

Отмеченные выше затруднения довольно успешно удается преодолеть с помощью предложенного нами [3] простого способа иммобилизации Аг, в основе которого лежит высушивание содержимого ячеек плат при $37^{\circ}C$ из растворов, приготовленных на бикарбонате аммония. Последний поддерживает необходимую концентрацию водородных ионов на протяжении всего времени иммобилизации и предотвращает возможную агрегацию Аг. При таком способе обеспечивается иммобилизация корпускулярных Аг, чего не достигается при инкубации их в ячейках плат (рис. 3). Кроме того, он повышает примерно на порядок эффективность иммобили-

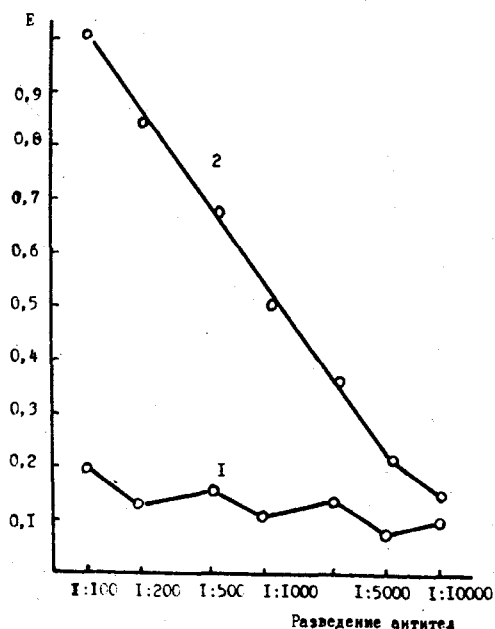


Рис. 3. Интенсивность иммунохимической реакции при различных способах иммобилизации золотистого стафилококка на платах.

1, 2 - иммобилизация антигена обычным и предложенным нами способом, соответственно.

По оси ординат - оптическая плотность содержимого ячеек плат, по оси абсцисс - используемые разведения антител.

зации растворимых Аг (рис. 4). Тем самым во столько же раз увеличивается чувствительность твердофазного ИФА на платах для растворимых Аг, что особенно важно при их низкой концентрации в исследуемых растворах. В случае же малого содержания определяемого Аг относительно уровня других наиболее эффективным является постановка анализа "сэндвичным" способом. Связывание казеина в качестве Аг с предварительно иммобилизованными Ат, по нашим данным, тоже примерно на порядок повышает чувствительность его анализа в лизате трансформированных по гену казеина клеток *E.coli*.

В заключение отметим, что нами рассмотрены лишь основные направления возможного повышения чувствительности твердофазного иммунохимического анализа. Конкретная их реализация может иметь самые разнообразные формы.

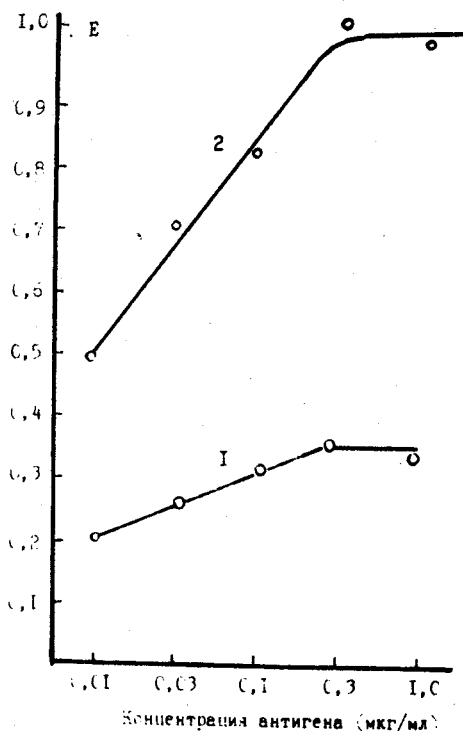


Рис. 4. Интенсивность иммунохимической реакции при различных способах иммобилизации глобина на платах.

I, 2 - иммобилизация антигена обычным и предложенным нами способом, соответственно.

По оси ординат - оптическая плотность содержимого ячеек плат, по оси абсцисс - используемые концентрации растворов антигена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобровник С.А., Стародуб Н.Ф. // Биохимия. - 1988. - Т. 53. - № 5. - С. 826-831.
2. Бобровник С.А., Стародуб Н.Ф. // Биохимия. - 1988. - Т. 53. - № 6. - С. 918-924.
3. Бобровник С.А., Стародуб Н.Ф. // Иммунология. - 1988. - № 5.
4. Иванов В.И., Кершулите Д.Р., Баев А.А. (мл.) и др. // Мол. биол. - 1985. - Т. 19. - № 4. - С. 955-963.
5. Стародуб Н.Ф., Артюх В.П., Назаренко В.И., Коломиец Л.И. // Укр. биохим. журнал. - 1987. - Т. 59. - № 3. - С. 108-120.

6. Стародуб Н.Ф., Ельская А.В. // Цитология и генетика. - 1988. - Т. 22. - № 5. - С. 61-72.
7. Стародуб Н.Ф., Коломиец Л.И., Калиниченко И.Е. // Иммунология. - 1988. - № 5.
8. Стьюард М. // Структура и функция антител / Под ред. Глинн Л., Стьюард М. - М.: Мир, 1983. - С. 113-147.
9. Brome S., Gilbert W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1978. - V. 75. - No. 6. - P. 2746-2749.
10. Clarke L., Hitzeman R., Garbon J. // Methods Enzymol. - 1979. - V. 68. P. 432-442.
11. Heltman D.M., Feramisco J.R., Fiddes J.C. et al. // Focus. - 1984. - V. 6. - No. 1. - P. 1-15.
12. Jackson T.M., Ekins R.P. // J. Immunol. Meth. - 1987. - V. 87. - No. 1. - P. 13-20.
13. Müller R. // J. Immunol. Meth. - 1980. - V. 34. - No. 4. - P. 345-352.
14. Naser W.L., Milltenburger H.G. // J. Gen. Virol. - 1983. - V. 64. - No. 3. - P. 639-647.
15. Nieto A., Gaya A., Jansa M. et al. // Mol. Immunol. - 1984. - V. 21. - No. 8. - P. 537-543.
16. Pullen G.R., Fitzgerald M.G., Mosking C.S. // J. Immunol. Meth. - 1986. - V. 86. - No. 1. - P. 83-87.
17. Reiser J., Wardale J. // Gene. - 1980. - V. 12. - No. 1. - P. 11-16.
18. Sampson I., Matthews J.A., Thorpe G.H.G., Kricka L.J. // Anal. Lett. - 1985. - V. 18. - No. B 11. - P. 1307-1320.
19. Stevens F.J. // Mol. Immunol. - 1987. - V. 24. - No. 10. - P. 1055-1060.

АГГЛЮТИНАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ В ИММУНОДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Л.Н.Падюков, В.А.Таранов

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова,
Центр микробиологии и иммунобиотехнологии АМН СССР

Основной задачей иммунодиагностики является быстрое получение достоверной информации о содержании тех или иных клинически значимых компонентов. Сотни методов, основанных на феномене взаимодействия антиген-антитело, широко используются в клинике для выявления инфекционных агентов и обычных для организма макромолекул, гормонов и лекарственных средств, антител и факторов неспецифической резистентности организма.

Достижения генетической и клеточной инженерии явились благодатным субстратом для развития новых методов иммунодиагностики, а также модернизации методов уже используемых для практики.

Методы иммунодиагностики можно условно разделить на три основные группы:

- прямые методы, при которых визуально или инструментально регистрируется непосредственная реакция антиген-антитело (например, большинство преципитационных методов),
- агглютинационные методы, основанные на использовании для проявления реакции антиген-антитело микрочастиц (эритроциты, полимерные частицы, бактериальные клетки),
- индикаторные методы, в которых для выявления реакции антиген-антитело используют различного рода метки (флуорохромы, ферменты).

В настоящем сообщении будет обсуждена группа агглютинационных методов, преимущественно в отношении их использования для диагностики инфекционных заболеваний. К этой группе мы относим методы, основанные на реакции пассивной (или непрямой) гемагглютинации, коагглютинации и латексагглютинации.

Исторически феномен агглютинации бактерий антисывороткой, открытый в 1896 г., был одной из первых иллюстраций реакции антиген-антитело. Хотя агглютинация бактерий как метод диагностики актуальна в бактериологии до сих пор, предложенная в 1946 г. реакция пассивной гемагглютинации резко изменила по-

ложение. Возникла возможность регистрировать антитела к отдельным антигенам и даже гаптенам, а также определять растворимые, а не только корпускулярные антигены. Реакции ко- и латексагглютинации, предложенные в 50-не годы и получившие бурное развитие в 70-80-ые, подняли иммунодиагностику еще на более высокий уровень.

Итак, методы агглютинации развивались на протяжении нескольких десятилетий и, как мы увидим позже, еще не исчерпали всех своих возможностей.

Три наиболее распространенные типа реакции: реакция пассивной гемагглютинации, коагглютинации и латексагглютинации требуют для своего осуществления три типа частиц с неодинаковыми свойствами. Свойства эритроцитов и золотистого стафилококка (обычно - протеин А содержащий штамм Cowan I) стандартизируются самой природой. Напротив, параметры полимерных частиц - латексов, как их сейчас называют, программируются при их изготовлении человеком. Обычные размеры эритроцитов находятся между 5 и 10 мкм, стафилококковых клеток - от 0,6 до 1,2 мкм. Суспензия латекса, названная так по аналогии с молочным соком каучуконосов (от латинского latex - сок), может содержать частицы различных размеров. Однако, для реакции латексагглютинации чаще всего используют однородные смеси со средним диаметром частиц около 1 мкм.

Все эти частицы получают нужные для иммунодиагностики свойства в процессе активации, или как это обычно называют - сенсibilизации. Простая физическая сорбция за счет гидрофобных взаимодействий частицы с иммуноглобулинами или другими белками применяется широко. Однако, химическое связывание с помощью бифункциональных агентов и аффинная сорбция являются более надежными способами сенсibilизации. Диагностикумы при этом получают более стабильными, а кроме того, можно регулировать количество связавшегося комплементарного агента. Следует также напомнить, что сам факт присутствия в образце, например, антигена не означает безусловной возможности агглютинации частиц антительного диагностикума. Агглютинация происходит в зоне эквивалентности, когда частицы диагностикума прореагируют попарно с антигеном. А это, в свою очередь, возможно когда антиген имеет как минимум два независимых реакци-

онноспособных участка эпитопа, а на частицах есть антитела по крайней мере к двум этим участкам.

При выявлении большинства белковых и, тем более, полисахаридных антигенов поликлональными антителами это условие выполняется автоматически. В случае же с использованием моноклональных антител приходится моделировать двухсайтовое связывание путем сенсibilизации частиц смесью двух типов моноклональных антител или смешивать в суспензию частицы, сенсibilизированные этими антителами раздельно.

Преодолев трудности сенсibilизации частиц, мы подходим к трудностям проведения реакции. Собственно говоря, проблем здесь не так уж много - это простые и быстрые методы: продолжительность реакции коаггуляции и латексагглютинации колеблется от нескольких секунд до нескольких минут. Реакция пассивной гемагглютинации, как правило, проводится дольше - час-полтора, за счет необходимости полного оседания эритроцитов в лунке планшета. Однако, в вариантах гемагглютинационных методов без осаждения агглютинатов реакция проходит значительно быстрее.

Практически, интенсивность агглютинации может различаться в зависимости от ряда причин. Предприняты попытки физического учета различий активности [5] реакций с помощью нефелометрии, а также на основе фотоакустического эффекта при воздействии монохроматического излучения [6]. Все же полуколичественная визуальная оценка остается доминирующей.

Более подробно необходимо остановиться на сравнении чувствительности различных методов, т.к. этот аспект имеет наибольшее практическое значение. Оказалось, что реально достижимая чувствительность зависит не только от метода, но главным образом, от свойств антигена и константы связывания реакции антиген-антитело. Например (табл. I, данные [2] с нашими дополнениями), в случае гемофильной палочки и пневмококка, наи-

более частых возбудителей бронхолегочных болезней, эти различия достигают одного порядка величины, тогда как различия в чувствительности разных методов могут достигать двух порядков. Преимущества ИФА и РИА по чувствительности могут быть не столь существенными в некоторых условиях. Так, при определении полирибозилфосфата - типоспецифического антигена *H. influenzae* типа

Таблица I

Чувствительность методов выявления бактериаль-
ных антигенов

Метод	Чувствительность, нг/мл	
	гемофильная палочка	пневмококк
ВИЭФ	2,5	25
Коагглютинация	5	30
Латексагглютинация	0,2	5
РИА	0,5	5
ИФА	0,1	1

ь (табл. 2) [3] в сыворотке крови реальная чувствительность ИФА ниже, чем латексагглютинация. А при обследовании сыворотки крови и мочи больных острой пневмонией капсульные полисахариды пневмококка определяются методами латексагглютинации более эффективно в некоторых группах больных (табл. 3) [8].

Преимущества методов коагглютинации и латексагглютинации перед преципитационными методами, такими, как ВИЭФ, более очевидны. Особенно они хорошо видны в динамике, когда при ан-

Таблица 2

Влияние антигенов гемофильной палочки типа б [3]

Исследованные образцы с бактериологическим подтверждением	Количество положительных образцов (%)		
	ИФА	КА	ЛА
Спинномозговая жидкость	100	100	100
Мокрота	82	53	25
Моча	87	53	57
Сыворотка крови	53	40	67

Таблица 3

Чувствительность различных методов определения антигенов пневмококка у больных с острой пневмонией [8]

Метод	Количество положительных образцов (%)			
	Больные с бактериемией		Больные без бактериемии	
	Сыворотка крови	Моча	Сыворотка крови	Моча
ВИЭФ	24	24	0	33
Латексагглютинация, диагностикум I	47	29	29	0
Латексагглютинация, диагностикум II	18	14	29	0
Коагглютинация	47	19	29	0
ИФА	76	5	14	0

тибиотикотерапии концентрация антигенов в образцах уменьшается. Если больной после нескольких дней самостоятельного лечения антибиотиками попадает к клинику, установление этиологии заболевания с помощью ВИЭФ затруднено.

Значение моноклональных антител для агглютинационных методов иммунодиагностики в перспективе очень велико. Как показали модельные эксперименты [10] (табл. 4), даже полученные аффинной хроматографией поликлональные антитела не дают возможности так эффективно связывать антиген, как гомогенный препарат моноклональных антител с высокой константой связывания.

Таблица 4

Достижимая концентрация антител на носителе [10]

Тип антител	(АТ)
Моноклональные	10^{-7}
Поликлональные очищенные аффинной хроматографией	3×10^{-8}
Из гипериммунной сыворотки	10^{-8}
После инфекции	10^{-9}

Принципиальное значение, конечно, имеет более высокая стандартность препаратов моноклональных антител в сравнении с антисыворотками.

"Филогенез" и "онтогенез" агглютинационных методов показывает их большие возможности (табл. 5). Прежде всего это простые методы. Как правило, для проведения анализа требуется лишь смешать исследуемый образец с суспензией диагностикума, и реакция проходит за небольшой промежуток времени. Это свойство позволяет очень широко применять агглютинационные методы

Таблица 5

Достоинства и недостатки агглютинационных методов

Достоинства	Недостатки
- простота	- полуколичественные методы
- экономичность	- неспецифические реакции
- высокая чувствительность	- взаимодействия частиц
- микрометоды и бесприборные методы	- инаktivация частиц
- быстрая подготовка персонала	
- использование комбинаций частиц	

в условиях, когда требуется быстрый анализ, когда необходимо проанализировать одновременно много образцов. Кроме того, такие виды анализа относительно дешевы. По данным ВОЗ, например определение микробных клеток гемофильной палочки с помощью латексагглютинации обходится в 2,5-5 раз дешевле, чем бактериологический анализ. Такие виды анализа особенно перспективны для обеспечения недорогого медицинского обслуживания [11]. Следует особо подчеркнуть, что эти достоинства не уменьшают высокой чувствительности методов.

Существенным достоинством агглютинационных методов является также то, что для проведения анализа не требуется специальной аппаратуры, как, например для ИФА, РИА и т.п. Детекция результата производится визуально - это позволяет также избежать сложных систем обработки данных и не требует длительной

подготовки персонала.

Агглютинационные методы обладают и другими очевидными достоинствами. В частности, использование смеси частиц дает возможность еще более упростить методику [4]. В тех же случаях, когда требуется более дифференцированная и сложная этиологическая диагностика, агглютинационные методы позволяют создавать удобные "панели" диагностикумов.

Подобные наборы на основе латексагглютинации, представлены, например, фирмой "Велком" (Великобритания) для идентификации различных групп стрептококков, установления этиологии гнойного менингита. Фирма "Фармация Диагностикс" (Швеция) выпускает наборы коагглютинационных диагностикумов для идентификации различных серогрупп гемофильной палочки, стрептококков, менингококков. Подобные препараты выпускаются большинством зарубежных фирм, специализирующихся на диагностических препаратах.

Однако, существуют и недостатки. Основная проблема, конечно, состоит в сложности количественного учета. Поэтому в большинстве случаев эти методы используются для качественной оценки.

Серьезным препятствием для проведения реакции агглютинации может быть наличие некоторых специфических и неспецифических компонентов исследуемого образца. Наиболее частые трудности связаны с присутствием антител к исследуемым антигенам. Связанные в иммунные комплексы антигены менее реакционно способны и могут не улавливаться при реакции с диагностикумом.

Некоторые другие вещества, например компоненты системы комплемента, приводят к неспецифическим реакциям [2].

Искажение реакции коагглютинации может наступать, кроме того, из-за наличия в образце антител к золотистому стафилококку. Такие ложноположительные и ложноотрицательные реакции особенно часто наблюдаются при анализе антигенов в образцах биологических жидкостей (сыворотка, СМЖ и т.п.).

Суспензия диагностикума является неустойчивой системой. Инактивация частиц происходит за счет десорбции антител (или антигена) с поверхности активированных частиц. Кроме того, для небольших частиц в жидкости большое значение имеют силы поверхностного натяжения и т.п., способные исказить резуль-

тат реакции.

Перечисленные трудности преодолеваются самыми различными путями в зависимости от целей, свойств частиц и т.д.

Перспективы в преодолении указанных трудностей и развитии методов агглютинации связаны как с использованием моноклональных антител и рекомбинантных продуктов (в т.ч. при диагностике СПИД) [9], но и с совершенствованием самих методов.

Корпорация "Ковалент Текнолоджи" (США) предложила интересный метод, объединяющий преимущества агглютинационных и индикаторных методов - это, так называемые иммунопалочки (*immuno-sticks, dipsticks*). К такой палочке привязаны антитела, с которыми реагирует определенный агент. Затем "конструкцию" отмывают от всего лишнего и погружают в суспензию частиц латекса, сенсibilизированных антителами к тому же антигену, но другой специфичности. Интенсивность изменения цвета палочки пропорциональна количеству связавшегося латекса, т.е. количеству выявленного антигена. В данном случае, конечно, классического феномена агглютинации не наблюдается, хотя всю конструкцию можно рассматривать как интегрированную частицу агглютината. Метод занимает не более 30 минут и обладает чувствительностью 10^3 - 10^4 бактериальных клеток или 1 нг/мл образца [7].

Постоянно развиваясь и используя новейшие достижения иммунологии и молекулярной биологии, методы иммунодиагностики выдерживают серьезный искусственный отбор со стороны исследователей и врачей-практиков. Более того, спектр этих препаратов расширяется и можно предположить, что благодаря успехам генной и клеточной инженерии эти простые и эффективные методы в будущем будут иметь еще больший вес в сравнении с другими методами иммунодиагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Coombs R.R.A. // *Med. Labor. Sci.* - 1987. - V. 44. - P. 66-72.
2. Coonrod J.D. // In: *The Direct Detection of Microorganisms in Clinical Samples*. Ed. by Coonrod J.D., Kunz L.J., Ferraro M.J. - Acad. Press. - 1983. - P. 135-142.
3. Drow D.L., Manning D.D. // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* - 1983. - V. 1. - P. 317-322.

4. Hadfield S.G. et al. // J. Clin. Microbiol. - 1987. - V. 25. - P. 1151-1154.
5. Hencel E. // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. - 1984. - V. 22. - P. 919-926.
6. Kitamori T. et al. // Acad. Chem. - 1987. - V. 59. - P. 2519-2522.
7. Klausner A. // BioTechnology. - 1987. - V. 5. - P. 8-10.
8. Lenthe-Eboa S. et al. // Eur. J. Clin. Microbiol. - 1987. - V. 6. - P. 28-34.
9. Riggan C.H. et al. // J. Clin. Microbiol. - 1987. - V. 25. P. 1772-1773.
10. Yolken R.H. // Rev. Inf. Diseases. - 1982. - V. 4. - P. 35-68.

КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ДАННЫХ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

М.Г.Вийкмаа, А.-В.Н.Микельсаар, Э.И.Юронен

НИИ общей и молекулярной патологии ТТУ,
Эстбиоцентр при АН ЭССР, Тарту

В каждой лаборатории, где разрабатываются и характеризуются моноклональные антитела (МКА), накапливается большое количество данных иммуноферментного анализа (ИФА). Для эффективного использования этих данных требуется автоматическая система обработки. С этой целью в нашей лаборатории используется система, включающая спектрофотометр (MR580, MICROELISA AUTOREADER, Dynatech Laboratories), персональный компьютер (Apple II plus, Apple Computer Inc.) и матричный принтер (Epson MX80).

Нами составлен набор Бейсик-программ, обеспечивающих обработку данных в различных случаях ИФА. В настоящей статье рассматриваются алгоритмы и продукты работы программ для 1) вычисления величины перекрестной реакции МКА с неспецифическими лигандами и 2) установления констант сродства МКА к антигенам.

Линейный регрессионный анализ

Основным приемом вычислений во всех программах является линейный регрессионный анализ по методу наименьших квадратов [1]. Сначала определяются следующие общие показатели для независимой (x) и зависимой (y) переменных:

арифметические средние -

$$\bar{x} = 1/N \cdot \sum x_i, \quad \bar{y} = 1/N \cdot \sum y_i;$$

суммы квадратических отклонений -

$$SQ_x = \sum x_i^2 - 1/N (\sum x_i)^2,$$

$$SQ_y = \sum y_i^2 - 1/N (\sum y_i)^2;$$

сумма произвольных отклонений -

$$SP_{xy} = \sum x_i y_i - 1/N \sum x_i \sum y_i,$$

где $N = k \cdot n$

k - число повторных рядов,

n - число разбавлений в ряду.

Далее вычисляются коэффициенты линейной корреляции -

$$r = SP_{xy} / \sqrt{SQ_x \cdot SQ_y}$$

и регрессии -

$$b_{(y/x)} = SP_{xy} / SQ_x \quad - \text{наклон линии регрессии,}$$

$$a_{(y/x)} = \bar{y} - b_{(y/x)} \cdot \bar{x} \quad - \text{асимптота линии регрессии.}$$

Программа для определения перекрестных реакций

Организация иммуноферментной системы. Программа основывается на методе конкурентного ИФА. Микротитрационный планшет покрывается равномерно специфическим для изучаемого антигена антигеном. В определенные ряды лунок добавляется моноклональное антитело с конкурентным веществом в различных концентрациях. Связанное на планшете антитело выявляется вторичным антителом к мышиным иммуноглобулинам, конъюгированным с пероксидазой. В случае данной программы все краевые лунки планшета оставлены в качестве отрицательного контроля: отсутствует грунтовый антиген (бланк-реакция). На одном планшете располагаются ряды разбавлений стандартного (специфического) антиге-

* * * CROSS-ELISA PROGRAM * * *

EXAMINER # REIN SIKUT
 DATE # 07.06.88
 PLATE # 1 (NUNC)
 ANTIBODY # T4-2B2
 STANDARD : T4 INHIBITOR 1: T3 INHIBITOR 2: RT3
 MAX. CONCENTRATION OF ANTIGENS = 7700 NMOL/L
 DILUTION FACTOR = 3
 ELISA: T4-BSA * 2B2+INHIBITOR * GOAT-ANTIMOUSE IG-PEROX

DYNATECH MICROELISA OPTIC DENSITY DATA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A BLANK:	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	10.000
B 0.000:	1.580	1.522	1.495	1.384	1.265	0.902	0.590	0.328	0.111	0.043	10.000	
C 0.000:	1.538	1.507	1.445	1.463	1.291	0.983	0.619	0.268	0.129	0.034	10.000	
D 0.000:	1.545	1.548	1.543	1.502	1.488	1.459	1.398	1.386	1.333	1.312	10.000	
E 0.000:	1.562	1.551	1.538	1.513	1.469	1.472	1.413	1.409	1.371	1.357	10.000	
F 0.000:	1.568	1.533	1.509	1.482	1.434	1.372	1.231	0.907	0.659	0.396	10.000	
G 0.000:	1.531	1.527	1.518	1.465	1.441	1.355	1.187	0.968	0.623	0.379	10.000	
H 0.000:	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	10.000	

Рис. 1. Протокольные и измеренные на фотометре данные ИФА из программы Cross-ELISA. Пример по определению перекрестных реакций моноклонального антитела T4.I-2B2 с триодтиронином (ряды планшета D и E) и обратным триодтиронином (ряды F и G) по сравнению со стандартным антигеном тироксином (ряды B и C). Краевые лунки планшета - бланк-реакции.

на и двух сравниваемых веществ, все в двух повторах (рис. 1). В первой лунке каждого ряда отсутствует конкурентное вещество (состояние максимальной реакции). Далее следует 9 лунок с конкурентным веществом в растущей концентрации. Ряды концентраций всех веществ одинаковы, в наномолях на литр.

Алгоритм программы. Степень перекрестной реакции изучаемого вещества с данным моноклональным антителом определяется относительно стандартного антигена, сравнивая концентрации конкурирующих веществ, при которых наблюдается 50-процентное снижение интенсивности реакции. Если при каком-нибудь веществе не происходит 50%-ного снижения реакции, то соответствующая концентрация определяется путем экстраполяции регрессионной линии; в случае достаточно длинного ряда разбавлений такой прием не вызывает большой ошибки (рис. 2, 3).

В роли независимой переменной выступает лог-концентрация (или степень разбавления) конкурентного вещества:

$$x_i = 8, 7, \dots, 0; \quad i = 2 \dots 10$$

Зависимая переменная представлена в виде логит-трансформации значений иммуноферментных реакций [2]:

$$y_i = \ln(D_i / (D_0 - D_i)),$$

где D_0 - интенсивность реакции при отсутствии конкурентного вещества,

D_i - интенсивность реакции при концентрации конкурентного вещества x_i .

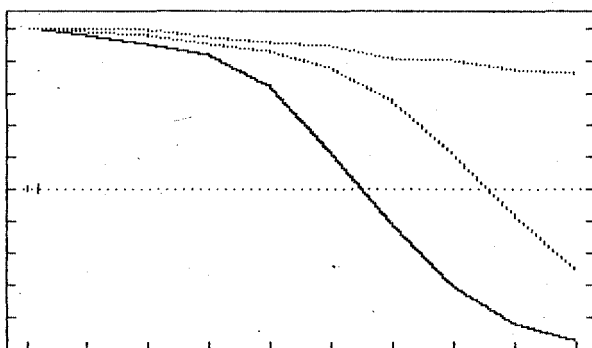
Между этими переменными вычисляется линейная регрессионная зависимость. На ее основе определяется лог-концентрация, а затем абсолютная концентрация вещества при 50%-ном уровне интенсивности реакции (D_{50}):

$$x = -a/b, \\ C_{50} = CA/DF^x,$$

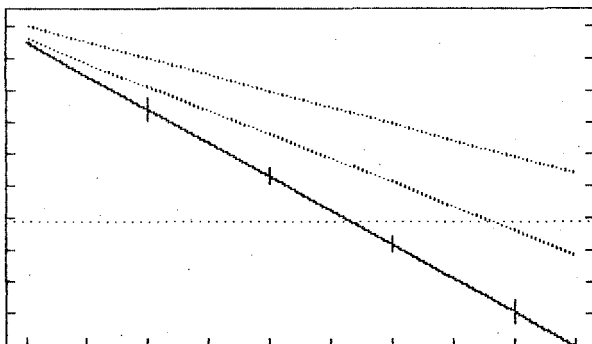
где a, b - коэффициенты регрессии,

CA - максимальная концентрация конкурентного вещества,

DF - фактор разбавления (2 или 3).



INITIAL DATA CURVES (OD-LOG)



REGRESSION LINES (LOGIT-LOG)

Рис. 2. Пример применения программы Cross-ELISA. Графическое изображение зависимости интенсивности ИФА-реакции от логистической концентрации конкурентного вещества. На вертикальной оси верхнего графика исходные оптические плотности, нижнего графика - регрессионные значения логит-трансформаций. Антитело: Т4.1-2В2. Кривые соответствуют разным конкурентным веществам: нижняя - тироксину (стандартный антиген), средняя - обратному триодтирону, верхняя - тиронину.

LINEAR REGRESSION ANALYSIS (DILUTION DEGREE <=> LOGIT)
AND ESTIMATES OF CROSSREACTIVITY IN RELATION TO: T4

STANDARD:			INHIBITORS:			
nmol/l	OD	X (Y)	OD1	X1 (ST)	OD2	X2 (ST)
0.000	1.5540	0.020	1.5540	0.020	1.5540	0.020
1.173	1.5145	1.765	1.5495	0.156	1.5300	0.976
3.520	1.4700	4.463	1.5405	0.503	1.5135	1.819
10.562	1.4235	7.840	1.5075	2.150	1.4735	4.230
31.687	1.2780	21.870	1.4785	3.904	1.4375	6.767
95.061	0.9425	81.933	1.4655	4.766	1.3635	12.977
285.185	0.6045	237.158	1.4055	9.289	1.2090	30.551
855.555	0.2980	777.218	1.3975	9.959	0.9375	83.270
2566.666	0.1200	2722.089	1.3520	14.063	0.6410	210.841
7700.000	0.0385	11419.311	1.3345	15.779	0.3875	518.517
* CORRELATIONS:			R0 = 0.9954	* CONC. (50%):	137.60	
			R1 = 0.9343		174429.84 *	
			R2 = 0.9954		1685.65	
* CROSSREACTIVITY TO 'T3':				0.08 %		
* CROSSREACTIVITY TO 'RT3':				8.16 %		

Рис. 3. Пример применения программы Cross-ELISA. Результаты регрессионного анализа и оценки степени перекрестных реакций моноклонального антитела T4.I-2B2 с триидтиронином (T3) и обратным триидтиронином (RT3) по сравнению со стандартным антигеном тироксином.

И, наконец, вычисляется степень перекрестной реакции с веществом j :

$$R_j = C50_{st} / C50_j \cdot 100 (\%),$$

где $C50_{st}$ - концентрация стандартного антигена при $D50$,

$C50_j$ - концентрация изучаемого вещества при $D50$.

Программа для определения константы аффинитета

Имуноферментный метод. Данная программа для определения аффинитета моноклональных антител к антигенам разработана на основе метода ИФА, предложенного Friguet с сотрудниками для установления константы диссоциации [3]. Растворы антитела при постоянной концентрации инкубируются в присутствии антигена в различных концентрациях до достижения равновесия (12-24 ч.). При этом требуется условие, что концентрация антитела в виде концентрации сайтов связывания была бы возможно низкой и концентрации антигена всегда превышали бы ее. Для определения концентрации свободного антитела в каждом растворе с помощью ИФА они переносятся в лунки микротитрационного планшета, предварительно покрытого тем же антигеном, и инкубируются в присутствии вторичного антитела, конъюгированного с пероксидазой. Все пробы анализируются в 2-4 повторях; на одном планшете можно одновременно определить аффинитет нескольких пар антитело-антиген (рис. 4).

Алгоритм программы. Если общая концентрация антитела известна (очищенный препарат моноклонального антитела), то концентрацию свободного антитела можно вычислять по следующему уравнению:

$$(1) \quad i/i_o = D/D_o,$$

- где i_o - общая концентрация антитела,
 i - концентрация свободного антитела,
 D_o - интенсивность имуноферментной реакции антитела в отсутствии антигена,
 D - интенсивность реакции свободного антитела в присутствии антигена при данной концентрации.

* 'AFFIN-ELISA' PROGRAM # ANTIBODY AFFINITY *

EXAMINER # ERKKI

DATE # 22.03.88.

PLATE # NUNC1.

1. ANTIBODY << ANTIGEN # 4A1.1 SUPER 1 << MB

ANTIBODY CONCENTRATION = 0 M

MIN. CONC. OF ANTIGEN = 3.57E-09 M # DILUTION FACTOR = 2

2. ANTIBODY << ANTIGEN # 4A1.1 SUPER 3000 << MB

ANTIBODY CONCENTRATION = 0 M

MIN. CONC. OF ANTIGEN = 3.57E-09 M # DILUTION FACTOR = 2

3. ANTIBODY << ANTIGEN # 3C1.2 SUPER 1*3000 << MB

ANTIBODY CONCENTRATION = 0 M

MIN. CONC. OF ANTIGEN = 3.57E-09 M # DILUTION FACTOR = 2

4. ANTIBODY << ANTIGEN # 3C1.2 SUPER 1*4000 << MB

ANTIBODY CONCENTRATION = 0 M

MIN. CONC. OF ANTIGEN = 3.57E-09 M # DILUTION FACTOR = 2

DYNATECH MICROELISA OPTIC DENSITY DATA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANK	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.011
B	0.706	0.627	0.627	0.302	0.316	0.272	0.766	0.699	0.627	0.586	0.669	0.642
C	0.610	0.511	0.508	0.206	0.216	0.205	0.653	0.634	0.598	0.537	0.569	0.572
D	0.478	0.406	0.404	0.145	0.125	0.120	0.575	0.565	0.556	0.458	0.485	0.475
E	0.289	0.226	0.216	0.036	0.037	0.042	0.436	0.420	0.382	0.329	0.341	0.345
F	0.076	0.059	0.055	0.006	0.005	0.006	0.285	0.293	0.332	0.223	0.230	0.196
G	0.018	0.010	0.016	0.006	0.000	0.004	0.148	0.161	0.137	0.105	0.113	0.108
H	0.020	0.011	0.004	0.003	0.000	0.015	0.090	0.086	0.061	0.072	0.068	0.084

Рис. 4. Протокольные и измеренные на фотометре данные ИФА из программы Affin-ELISA для определения констант аффинитета моноклональных антител к антигенам. На планшете 4 пары антитело-антиген, все в трех повторах. В ряду А - бланк-реакции. В ряду В - реакции антител в отсутствии антигена. В рядах С...Н - реакции антител в присутствии антигена в нарастающей концентрации. В данном примере концентрации антител неизвестны. использовались супернатанты от культур гибридом.

На основе этого уравнения можно также вычислять концентрации связанного антитела (i_x) и свободного антигена (a):

$$(2) \quad i_x = i_o - i = i_o \cdot (D_o - D) / D_o,$$

$$(3) \quad a = a_o - i_x = a_o - i_o \cdot (D_o - D) / D_o,$$

где a_o - общая концентрация антигена.

Константу аффинитета можно определить как коэффициент регрессии из линейных уравнений Скэтчарда или Клотца:

$$(4) \quad i_x / a = 1/K \cdot (i_o - i_x) \quad - \text{ (уравнение Скэтчарда),}$$

$$(5) \quad 1/i_x = 1/i_o + K/(a \cdot i_o) \quad - \text{ (уравнение Клотца),}$$

где K - константа аффинитета антитела.

Эти уравнения можно переписать в развернутом форме, соответственно:

$$(6) \quad \frac{(D_o - D) / D_o}{a_o - i_o \cdot (D_o - D) / D_o} = 1/K \cdot (1 - (D_o - D) / D_o),$$

$$(7) \quad D_o / (D_o - D) = 1 + \frac{K}{a_o - i_o \cdot (D_o - D) / D_o}$$

В такой форме уравнения Скэтчарда и Клотца и применяются в рассматриваемой программе.

Если концентрация антитела очень низка по сравнению с концентрацией антигена ($a_o > 10 \cdot i_o$), то $a \approx a_o$ и уравнения (6) и (7) становятся независимыми от общей концентрации антитела (i_o). Получим, соответственно:

$$(8) \quad (D_o - D) / D_o \cdot 1/a_o = 1/K \cdot (1 - (D_o - D) / D_o),$$

$$(9) \quad D_o / (D_o - D) = 1 + K/a_o.$$

На основе последних уравнений можно определить константы аффинитета неочищенных моноклональных антител, например антител в супернатантах от гибридомных культур и в асцитных жидкостях. Нужно использовать только сильно разбавленные растворы.

Наша программа допускает вычисление констант аффинитета как очищенных, так и неочищенных антител как по уравнению Скэтчарда, так и по уравнению Клотца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rasch D. / Biometrie. Einführung in die Biostatik. - Berlin. VEB Deutscher Landschaftsverlag, 1983.-
2. Ritchie D.G., Nickerson J.M., Fuller G.M. // Methods Enzymol. - 1983. - V. 92, Part E. - P. 577-588.
3. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L. // J. Immunol. Methods. - 1985. - V. 77. - P. 305-319.

НОВЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАКТОРОВ РОСТА НЕРВОВ

У.В.Арумян

Институт химической и биологической физики АН ЭССР

Фактор роста нервов (ФРН) - это нейротрофический белок, вызывающий морфологическую и биохимическую дифференцировку периферических, симпатических и сенсорных нейронов. В нашей лаборатории занимаются изучением ФРН из ядовитой железы гюрзы *Vipera lebetina* [1], который является гликопротеидом с молекулярным весом 32500 и не образует комплексы с α - и γ -субчастицами, как это имеет место в случае классического ФРН из слюнной железы мыши. Для определения ФРН мы использовали недавно разработанный новый метод - флуороиммуноанализ временного разделения (TR-FIA), основанный на уникальном свойстве флуоресценции лантанидов [2]. Этот метод уменьшает относительно высокую собственную флуоресценцию биологических образцов, так как сигнал флуоресценции детектируется через некоторое время после возбуждения образца, когда его собственная флуоресценция уже погасла.

Материалы и методы

ФРН из яда гюрзы был очищен по ранее описанному методу [1]. Поликлональные антитела к этому ФРН были афинно-очищены [3]. Мышиный ФРН и афинно-очищенные антитела к ним были получены из Института физиологии АН БССР, Минск. Антитела конъюгировали с европием по методу [10]. TR-FIA проводили по принципу твердофазного иммунотеста типа сэндвич [4]. Все экспери-

ментальные и контрольные точки провели в трех повторах. Для каждой точки разбавления ФРН использовали отдельные пипеточные наконечники. Клетки РС12 выращивали, как описано раньше [1].

Результаты

Для выработки чувствительного TR-FIA мы конъюгировали с европием поликлональные антитела к ФРН мыши и к ФРН гюрзы. Зависимость чувствительности определения ФРН гюрзы от концентрации антител показана на рис. 1А и Б. Лунки были насыщены ниж-

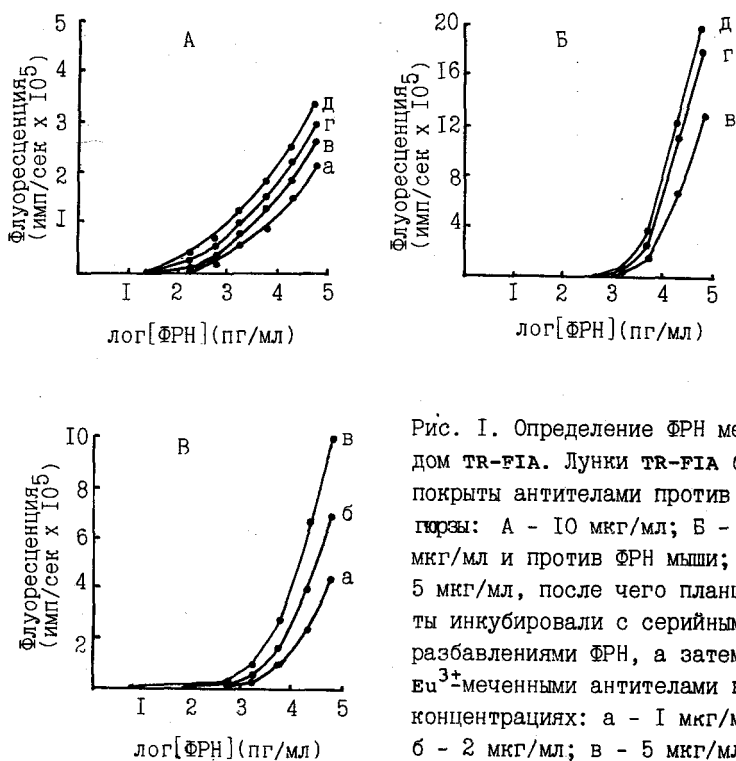


Рис. 1. Определение ФРН методом TR-FIA. Лунки TR-FIA были покрыты антителами против ФРН гюрзы: А - 10 мкг/мл; Б - 50 мкг/мл и против ФРН мыши; В - 5 мкг/мл, после чего планшеты инкубировали с серийными разбавлениями ФРН, а затем с Eu^{3+} -меченными антителами в концентрациях: а - 1 мкг/мл; б - 2 мкг/мл; в - 5 мкг/мл; г - 7,5 мкг/мл; д - 10 мкг/мл.

ними антителами при 50 мкг/мл. Нижний предел чувствительности, полученный при концентрации нижних антител 5 мкг/мл и 10 мкг/

/мл, был 40 пг/мл. Дальнейшее повышение концентрации нижних антител уменьшало чувствительность теста, но увеличивало линейную область определения стандартной кривой (рис. 1).

Наилучшая чувствительность определения ФРН получена при концентрации Eu^{3+} -меченых антител 5-10 мкг/мл. Дальнейшее повышение концентрации конъюгата не улучшало чувствительность (данные не показаны на рис. 1), а при 1 мкг/мл предел чувствительности повышался на 200 пг/мл.

Мы определили нижний предел TR-FIA и для мышиногo ФРН. Как показано на рис. 1В, при концентрации нижних антител 5 мкг/мл и Eu^{3+} -меченных антител - 1 мкг/мл, 2 мкг/мл и 5 мкг/мл нижний предел чувствительности TR-FIA составил 10 пг/мл ФРН. Таким образом, наш TR-FIA является более чувствительным для мышиногo ФРН, чем для ФРН гюрзы.

Для дальнейших анализов мы рутинно использовали концентрации для нижних антител - 5 мкг/мл, а Eu^{3+} -меченных антител - 1-2 мкг/мл.

С целью изучения скорости потребления из среды мышиногo ФРН клетками PC12 мы инкубировали их в минимальном объеме среды (200 мкл) с ФРН в концентрации 5 нг/мл, которая является в пределах K_d ФРН. Через 3; 6; 12; 24 и 48 час. мы полностью отделяли среды от клеток, сохраняли их в замороженном виде до конца эксперимента и определяли концентрацию ФРН при помощи TR-FIA. Результаты показаны на рис. 2В. Через 12 часов ФРН почти полностью исчезал из среды, а неспецифическая адсорбция его на культуральной пластиковой посуде или на миеломных клетках, не имеющих рецепторов ФРН, была невелика. Наоборот, ФРН гюрзы не исчезал из среды даже через 48 часов (рис. 2А и Б), когда клетки имели уже маленькие нейриты. Как показано на рис. 2, это имеет место при очень большом интервале концентрации и, поэтому, не связано с превышением величины K_d (K_d связывания ФРН гюрзы с его рецептором на клетках PC12 не известна).

Обсуждение

Новый иммунофлуоресцентный метод, основанный на временно-разрешенной флуоресценции европия, позволяет определять мышинный ФРН в минимальной концентрации 10 пг/мл, а ФРН гюрзы

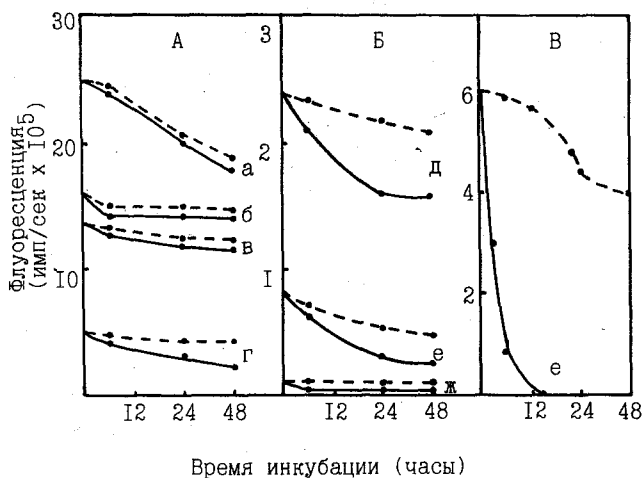


Рис. 2. Определение потребления ФРН из среды клетками PC12 методом TR-FIA. Обозначения: А и Б - ФРН гюрзы; В - ФРН мышы. — - клетки PC12; - - - - контрольные лунки со средой и миеломными клетками (эти два контроля были практически идентичными). Концентрации ФРН: а - 1 мкг/мл; б - 500 нг/мл; в - 200 нг/мл; г - 50 нг/мл; д - 30 нг/мл; е - 5 нг/мл; ж - 1 нг/мл.

- 40 пг/мл. Метод удобен и не требует длительной работы. Таким образом, при определении ФРН чувствительность TR-FIA равна чувствительности радиоиммуноанализа [5] и иммуноферментного анализа [6]. Высокая чувствительность TR-FIA определения ФРН и воспроизводимостью анализа позволяют рекомендовать этот метод для рутинного определения ФРН в нервной системе.

Потребление мышинного ФРН из среды клетками PC12, наверное, связано с его интернализацией [7]. Экзопроотеазы клеток PC12 не разрушают ФРН в среде, содержащей 10 % сыворотки, как показано Лейером и Шутером [8]. Совсем неожиданным является тот факт, что ФРН гюрзы не интернализируется клетками PC12, хотя он вызывает их дифференцировку. Этот факт согласуется с выводами Кхана и др. [9], что рецептор ФРН имеет протеазную ак-

тивность и отделяет фрагмент из молекулы ФРН. Возможно, что мышиный ФРН теряет при этом свои антигенные детерминанты, а ФРН гюры сохраняет их. Нельзя исключать и возможность, что эти два ФРН совсем по разному взаимодействуют с рецептором.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arumäe U., Siigur J., Neuman T., Saarma M. // Molec. Immunol. - 1987. - V. 24. - P. 1295-1302.
2. Furukawa S., Kamo I., Furukawa Y., Akazawa S., Satoyoshi E., Itoh K., Hayashi K. // J. Neurochem. - 1983. - V. 40. - P. 734-744.
3. Hemmälä I. // Clin. Chem. - 1985. - V. 31. - P. 359-370.
4. Khan A.A., Pearce F.L., Vernon C.A. // Cell Biochem.Func. - 1983. - V. 1. - P. 84-86.
5. Layer P., Shooter E.M. // J. Biol. Chem. - 1983. - V. 258. - P. 3012-3018.
6. Rohrer H., Schäfer T., Korsching S., Thoenen H. // J. Neurosci. - 1982. - V. 2. - P. 687-697.
7. Siigur E., Neuman T., Järve V., Tara A., Siigur J. // Comp. Biochem. Physiol. - 1985. - V. 81B. - P. 211-215.
8. Sinijärv R., Järvekülg L., Andreeva E., Saarma M. // J. Ger Virol. - 1988. - V. 69. - P. 991-998.
9. Suda K., Barde Y.-A., Thoenen H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1979. - V. 75. - P. 4042-4048.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ К ИНСУЛИНОПОДОБНОМУ РОСТОВОМУ ФАКТОРУ-I С ПОМОЩЬЮ АНТИТЕЛ К РАЗЛИЧНЫМ УЧАСТКАМ МОЛЕКУЛЫ ИНСУЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА

И.И.Бабиченко

Университет дружбы народов им. П.Лумумбы, Москва

Пептидные гормоны инсулин и инсулиноподобные ростовые факторы (ИПРФ) обладают способностью вызывать сходные биологические ответы за счет наличия гомологичных участков в первичной структуре пептидов [4,11], а также единых либо подобных, осуществляющихся посредством специфических рецепторных образований, эфферентных механизмов их влияния [9].

Это обстоятельство и послужило основой для изучения рецепторов к ИПРФ-I с помощью антител к различным участкам молекулы инсулинового рецептора (ИР) человеческой плаценты. Данный подход стал возможным после того, как проф. Н. Янаихара [16] на основе информации о первичной структуре предшественника кДНК ИР человеческой плаценты [14] удалось получить антитела к различным участкам молекулы рецептора, которые, учитывая высокую специфичность иммунологических методов, способны взаимодействовать с определенными участками α - и β -субъединиц молекулы ИР. Иммуногистохимическое тестирование антисывороток выявило их высокую и специфичную иммунореактивность с ИР плаценты и печени человека [17].

Методика исследований. Выявление рецепторов осуществляли непрямим иммуногистохимическим методом. В качестве первичных были использованы кроличьи антисыворотки (АС) в разведении 1:100 и 1:400 против синтетических пептидов с аминокислотной последовательностью, соответствующей определенным участкам α -субъединицы АС-1 (9-25), АС-2 (30-61), АС-3 (48-77), АС-4 (48-109) и β -субъединицы АС-31 (736-760), АС-27 (957-980), АС-23 (1012-1042), АС-25 (1139-1171) ИР человеческой плаценты. Сыворотки были получены и любезно предоставлены для проведения исследований проф. Янаихара. Иммунологическая активность сывороток определялась, используя соответствующие пептиды, меченные ^{125}I [16]. В качестве негативного контроля служила неиммунная кроличья сыворотка. Вторичные антитела представляли Fab-фрагменты ослиных антикроличьих иммуноглобулинов в разведении 1:200, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma VI, USA) периодатным методом [15]. Эксперименты проводились на 6 контрольных 21-дневных и 3 взрослых крысах линии Вистар. Кроме этого было использовано 6 экспериментальных 21-дневных и 5 взрослых животных с различным функциональным состоянием, включая стереотаксическое введение в правый боковой желудочек мозга 1 ЕД инсулина в 10 мкл раствора (HUMALIN R U-100, Sinogi Pharm. Co., Japan) и внутрибрюшинное введение 1 ЕД инсулина в 200 мкл физиологического раствора.

На светооптическом уровне иммуногистохимическую активность каждой АС проверяли на срезах печени, срединного возвышения гипоталамуса и обонятельных луковиц мозга крыс. Негативным

контролем служили срезы печени и мозга, обработанные неиммунными кроличьими сыворотками. Из криостатных срезов участков исследуемых тканей с высокой интенсивностью иммуногистохимической реакции после соответствующей обработки по методу Накане [8] готовили ультратонкие срезы, которые просматривали под электронным микроскопом без дополнительного контрастирования.

Результаты исследования. В первой экспериментальной серии проводили исследование специфичности взаимодействия антисывороток с ИР печени крыс. Светооптический анализ криостатных срезов контрольных и опытных животных показал, что в печени крыс практически со всеми исследованными антисыворотками, за исключением АС-25, выявилась положительная иммунопероксидазная реакция, при этом наибольшая интенсивность окрашивания отмечалась с АС-1, АС-3 и АС-31. Нерастворимые продукты окисления диаминобензидина (ДАБ) располагались на цитоплазматической мембране и в цитоплазме гепатоцитов в виде мелкой зернистости, а также на эндотелиальных клетках сосудов.

При электронно-микроскопическом исследовании с АС-1, АС-3 и АС-31 печени экспериментальных животных через 30 минут после интраперитонеального либо интравентрикулярного введения инсулина на ультратонких неконтрастированных срезах выявлялись скопления электронно-плотных продуктов иммунопероксидазной реакции в области инвагинаций цитоплазматической мембраны гепатоцитов, представляющих морфологическое выражение процесса эндоцитоза. В цитоплазме гепатоцитов продукты ДАБ реакции располагались на крупных вторичных лизосомах и небольших секреторных гранулах с плотным центром, распределяющихся вокруг элементов пластинчатого комплекса.

Учитывая тот факт, что сходная ультраструктурная локализация ИР была отмечена и другими авторами при введении ^{125}I -меченного инсулина [2] и исследованиях процессов интернализации ИР в жировой ткани с помощью антител, меченных ферритином [13], описанные нами особенности распределения продуктов ДАБ реакции в гепатоцитах представляют процесс интернализации периферических ИР печени.

Во второй серии экспериментов иммуногистохимические исследования проводили на срезах срединного возвышения гипота-

ламуса, в наружной зоне которого автораддиографическими методами на основании специфического связывания радиоактивно меченного лиганда показано распределение рецепторов к ИПРФ-I [1]. При нанесении антисывороток на срезы гипоталамуса мозга контрольных крыс иммунопероксидазная реакция выявлялась только с АС-3, гранулы ДАБ реакции распределялись в области синусоидных капилляров наружной части срединного возвышения. Специфическое окрашивание эндотелиальных клеток крупных сосудов мозга отмечается на срезах со всеми исследованными антисыворотками.

В свою очередь иммуногистохимические исследования обонятельных луковиц мозга, в которых, по данным [5], показана najwyżшая концентрация центральных ИР мозга, не выявили специфического распределения продуктов иммунохимической реакции.

Сравнение иммунологических реакций на срезах печени и мозга свидетельствует о том, что выявленные нами в срединном возвышении гипоталамуса рецепторные белки существенно различаются по своей первичной структуре, за исключением небольшого участка с аминокислотной последовательностью 48-77, соответствующей α -субъединице ИР плаценты.

Последующие эксперименты были направлены на исследование природы и ультраструктурной локализации продуктов иммуноцитохимических реакций в наружной зоне срединного возвышения гипоталамуса.

В результате взаимодействия антисыворотки АС-3 со срезами мозга контрольных животных электронно-плотные продукты ДАБ реакции выявляются на мембранах гранулярной эндоплазматической сети и цитоплазматических мембранах фибробластов, расположенных в перикапиллярном пространстве синусоидных капилляров срединного возвышения гипоталамуса. Специфическое окрашивание отмечается в виде мелких электронно-плотных гранул, распределяющихся вдоль мембран.

В срединном возвышении экспериментальных животных через 24 часа после интравентрикулярной инъекции I ЕД инсулина продукты иммунопероксидазной реакции распределяются как на мембранах, так и в крупных лизосомах фибробластов, что свидетельствует об активном процессе интернализации выявленных рецепторов.

Обсуждение результатов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммуногистохимические исследования с помощью антител к различным участкам молекулы ИР человеческой плаценты позволяют выявить распределение этих рецепторов в печени крыс, что подтверждает данные о сходном строении ИР плаценты и печени, кроме этого, основываясь на наших экспериментальных данных, можно полагать, что первичная структура этих рецепторных белков во многом гомологична и ИР эндотелиальных клеток сосудов.

Наши данные свидетельствуют о том, что выявленные в фибробластах рецепторные белки, несмотря на их способность к интернализации при введении инсулина, характерную для ИР печени и плаценты, не являются истинными ИР.

В настоящее время кроме ИР известны также две группы рецепторов, относящихся к ИПРФ-I и ИПРФ-II. Причем только рецепторы к ИПРФ-I распределяются в наружной зоне срединного возвышения [1] и способны к интернализации в присутствии инсулина [12]. В работах с моноклональными антителами к ИР человеческой плаценты [6] было показано, что эти антитела взаимодействуют также и с α -субъединицей рецепторов ИПРФ-I. Основываясь на этих литературных данных, мы можем отнести рецепторные образования, выявленные в настоящем иммуногистохимическом исследовании с помощью АС-3 ИР плаценты, к периферическим рецепторам ИПРФ-I.

Физиологическое значение α -субъединицы в молекулах инсулинового и ИПРФ-I рецепторов - химическое связывание с лигандом, в результате которого β -субъединица проявляет тирозин фосфокиназную активность и подвергается аутофосфорилированию [3,10].

По-видимому, существованием в α -субъединице рецептора к ИПРФ-I гомологичного участка с α -субъединицей ИР, который, по нашим данным, может соответствовать аминокислотной последовательности 48-71, можно объяснить тот факт, что инсулин, обычно используемый для стимуляции тирозин киназной активности ИР, способен вызывать аналогичный эффект и в β -субъединице ИПРФ-I рецепторов [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Bohannon N.J. et al. // *Endocrinology*. - 1986. - V. 119. - No. 2. - P. 943-945.
2. Carpenter J.-L. et al. // *Experimentia*. - 1986. - V. 42. - No. 7. - P. 734-744.
3. Czech M.P. // *Annu. Rev. Physiol.* - 1985. - V. 47. - P. 357-381.
4. Jansen M. et al. // *Nature*. - 1983. - V. 306. - No. 5943. - P. 609-611.
5. Havrankova J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1978. - V. 75. - No. 11. - P. 5737-5741.
6. Herrera R. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1986. - V. 261. - No. 6. - P. 2489-2491.
7. Lowe W.L.Jr., Le Roith D. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1986. - V. 134. - No. 2. - P. 532-538.
8. Nakane P.K. // *Annu. New York Acad. Sci.* - 1975. - V. 254. - P. 203-211.
9. Nissley S.P., Haskell J.F. // *J. Cell Sci.* - 1985. - V. 3 Suppl. - P. 39-51.
10. Rechler M.M., Nissley S.P. // *Annu. Rev. Physiol.* - 1985. - V. 47. - P. 425-442.
11. Rinderknecht E., Humbel R.E. // *J. Biol. Chem.* - 1978. - V. 253. - No. 8. - P. 2769-2776.
12. Rosenfeld R.G., Dollar L.A. // *J. Clin. Endocrinol. Metabolism*. - 1982. - V. 55. - No. 3. - P. 434-440.
13. Smith R.M. et al. // *J. Cell. Physiol.* - 1985. - V. 123. - No. 2. - P. 169-179.
14. Ullrich A. et al. // *Nature*. - 1985. - V. 313. - No. 6005. - P. 756-761.
15. Wilson M.B., Nakane P.K. : *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. - New York: Biomedical Press, Elsevier/North-Holland, 1978. - P. 215-224.
16. Yanaihara N. et al. // *Acta Histochem. Cytochem.* - 1986. - V. 19 Suppl. - S-11.
17. Yanaihara C. et al. // *Acta Histochem. Cytochem.* - 1987. - V. 20. - No. 2. - P. 245-250.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К Мп-ЗАВИСИМОЙ ДНКазе ХРОМАТИНА ПЕЧЕНИ КРЫС

М.М.Белова, Е.Ю.Котляр, Н.Л.Зоткина, Н.Г.Хамидуллина,
Е.В.Короткова, Л.Я.Махмутова, В.Г.Винтер

Казанский государственный университет

ДНКазы, локализованные в ядрах клеток, в последнее время привлекают самое пристальное внимание исследователей. В Казанском университете изучается нейтральная Мп-зависимая ДНКаза хроматина печени крыс [1,2]. С помощью поликлональных антител изучена локализация фермента в клетке и в структурах хроматина, показано участие ДНКазы в инициации синтеза ДНК [3,4]. Применение моноклональных антител (МКА) расширит возможности для дальнейшего изучения функций этого фермента в клетке. Использование МКА в качестве аффинного иммуносорбента упростит трудоемкие методы выделения и очистки фермента.

Целью настоящей работы явилось получение и характеристика МКА к Мп-зависимой ДНКазе хроматина печени крыс.

Условия эксперимента

Для иммунизации животных использовали препарат нейтральной Мп-зависимой ДНКазы хроматина печени крыс с удельной активностью 600 ед/мг, выделенный из ядер клеток печени крыс. Для отбора позитивных гибридом применяли высокоочищенный препарат фермента с удельной активностью 6000 ед/мг, полученный после нескольких стадий очистки, включающих хроматографию на гидроксилapatите (ГАП), препаративное изоэлектрофокусирование (ИЭФ) и хроматографию на голубой сефарозе (ГС) (табл. I).

В качестве доноров иммунных селезенки использовали мышей самок линии ВАВ/с в возрасте 4-х недель. Фермент вводили внутрибрюшинно в составе полного адьюванта Фрейнда. Схема иммунизации мышей ДНКазой хроматина представлена в табл. 2.

Суммарное количество белка, которое получала каждая мышь за цикл иммунизации, составляло 0,6 мг белка. Спустя 40 дней, за три дня до начала гибридизации, животным вводили внутривенно 0,2 мг белка без адьюванта.

Клеточная линия и получение гибридом. Культивирование клеток проводили на среде RPMI-1640 с добавлением 10-15 % эм-

Таблица 1

Очистка нейтральной Мп-зависимой ДНКазы
хроматина печени крыс

Стадия очистки	Суммар- ный бе- лок	Суммар- ная ак- тивность	Удельная активность ед/мг	Выход в %	Степень очистки
Исходная фрак- ция 0,4	1326,0	79560	60	100,0	1,0
Хроматография на ГАП	84,0	18480	220	23,2	3,7
Осаждение суль- фатом аммония, обессоливание на G-25	56,0	17696	316	22,2	5,3
Препаративное ИЭФ	1,8	3780	2100	4,7	35,0
Хроматография на ГС	0,08	480	6000	0,6	100,0

Таблица 2

Схема иммунизации мышей ДНКазой хроматина
печени крыс

Инъек- ции	Способ иммунизации	Антигенный материал (доза на 1 мышь в мг белка)
1	Внутрибрюшинно в составе полного адьюванта Фрейнда. Интервал 7 дней	0,04
2	- " -	0,08
3	- " -	0,16
4	- " -	0,32
5	Интервал 40 дней Внутривенно	0,20

бриональной телячьей сыворотки (фирма "Flow"), 10 мМ буфера Нерес, 2 мМ L-глутамин. Селективная среда ГАТ для выращивания гибридом включала в себя гипоксантин 1×10^{-2} М, аминоптерин 4×10^{-5} М, тимидин $1,6 \times 10^{-3}$ М ("Sigma"), 0,2 ЕД/мл инсулина, 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанола. Гибридомы получали по методу Келлера и Мильштейна [5]. Лимфоциты и миеломные клетки линии SP2/0 брали в соотношении 10:1. Для слияния клеток применяли 50 % полиэтиленгликоль м.в. 1540 ("Koch-Light"). В качестве фидерных клеток на всех этапах добавляли перитонеальные макрофаги сингенных мышей. Клетки инкубировали в 96-луночных планшетах ("Линбро") при 37° С в атмосфере с 5 % CO₂.

Скрининг гибридом проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [6] на полистироловых планшетах Московского завода медполимеров. В качестве конъюгата использовали аффинно очищенные антивидовые антитела (АТ) против IgG мыши, меченные пероксидазой хрена ("Bio-Rad"). Оптическую плотность продукта пероксидазной реакции измеряли при длине волны 492 нм на автоматическом 8-канальном денситометре "Мультискан" ("Flow").

Специфичность МКА, синтезируемых гибридомами, определяли также в реакции ингибирования активности фермента в присутствии АТ. Активность фермента определяли по приросту кислоторастворимых продуктов гидролиза денатурированной ДНК [7] и выражали в спектрофотометрических единицах (сп.ед.) увеличения кислоторастворимых продуктов при 260 нм на 1 мл фермента за 1 час инкубации. Ингибирующую активность АТ определяли как разность между исходной и остаточной активностями фермента и выражали в %.

Клонирование гибридом проводили методом предельных разведений [8].

Получение асцитных препаратов АТ. Для получения асцитной жидкости вводили по 5-7 млн. гибридомных клеток в брюшную полость мышей-самок линии BALB/c, предварительно сенсibilизированных пристаном.

Концентрирование и очистку МКА проводили методом аффинной хроматографии с использованием белка-A, иммобилизованного на сефарозе [9].

Результаты и обсуждение

Для гибридизации были использованы две мыши, сыворотка крови которых имела титр АТ к Мп-зависимой ДНКазе хроматина печени 1:10 и 1:20 в тесте ИФА. В результате гибридизации из 176 лунок, в которых культивировались гибридомы, 120 имели растущие клоны. Первичный скрининг колоний гибридных клеток, проводимый методом ИФА, позволил выявить 40 клеточных культур, которые синтезировали АТ к ДНКазе хроматина, что составило 33 % от общего количества полученных гибридом (табл. 3).

Таблица 3

Эффективность гибридизации при получении гибридом, синтезирующих МКА к нейтральной Мп-зависимой ДНКазе хроматина печени крыс

Отношение спленоцитов к SP2/0 клеткам миеломы	10:1
Количество засеянных лунок	176
Количество лунок с растущими клонами	120
Количество лунок с позитивными гибридомами (% от растущих клонов)	33

Из литературы известно, что применительно к растворимым антигенам процент позитивных гибридом невысок: 22 % позитивных гибридом получено к нитратредуктазе [10], другие авторы к растворимым антигенам получали менее 1 % позитивных гибридом [11].

Следует отметить, что в течение первых недель после слияния гибридные клетки теряют способность синтезировать АТ. Это может быть обусловлено утратой способности синтезировать тяжелые или легкие цепи в связи с потерей хромосом или связано с преимущественным ростом примешивающихся клонов [12].

После нескольких пассажей семь культур, обозначенных нами 2В, 2С, 2Д, 2Е, 2F, 2G, 2Н, синтезировали АТ, выявляемые методом ИФА, и способные ингибировать активность фермента в системе *in vitro*. Характеристика этих культур представлена в

табл. 4. Культуры 2В и 2Д были использованы в дальнейшей работе, остальные культуры были заморожены.

Таблица 4

Характеристика гибридных культур, синтезирующих антитела к Мп-зависимой ДНКазе хроматина печени крыс

Культура	ИФА, 492 нм	Ингибирующая активность, %
2В	0,476	20,3
2С	0,217	72,2
2Д	0,290	78,0
2Е	0,397	40,5
2F	0,643	38,0
2G	0,277	55,7
2H	0,315	40,0

В результате клонирования и реклонирования было отобрано два клон, продуцирующих МКА к Мп-зависимой ДНКазе. Клоны, обозначенные нами 2В1 и 2Д1, были размножены в культуре и привиты сингенным мышам для получения асцита. Асцитные препараты АТ очищали от примесных белков аффинной хроматографией на протеин-А-сефарозе. Характеристика МКА к Мп-зависимой ДНКазе представлена в табл. 5. МКА обоих клонов связывались с ферментом в тесте ИФА, причем титр МКА в асцитной жидкости и в препаратах МКА, полученных после аффинной хроматографии, значительно превышали титры АТ в культуральной среде. Однако, очищенные МКА не оказывали ингибирующего действия на активность ДНКазы хроматина с денатурированной ДНК. По-видимому, отобранные нами клоны синтезировали МКА, которые связывались с ферментом вне активного центра. Подавление активности фермента АТ гибридных неклонированных культур (табл. 4) можно объяснить образованием комплекса фермента с несколькими АТ, специфичными к различным антигенным детерминантам.

Полученные гибридомы являются первым шагом в деле создания спектра МКА, реагирующих с различными антигенными детер-

Таблица 5

Характеристика МКА к Мп-зависимой ДНКазе
хроматина печени крыс

Клоны	Титры антител* (ИФА)			Ингибирующая актив- ность очищенных МКА
	Культураль- ная жидкость	Асцитная жидкость	Очищенные МКА**	
2В1	8	160	3200	0
2Д1	4	80	1600	0

* Титр - величина, обратная наибольшему разведению, давшему положительную реакцию.

** Исходная концентрация белка в препаратах после аффинной хроматографии 0,6 мг/мл.

минантами фермента. Определение индивидуальных иммунных детерминант в молекуле белка ДНКазы хроматина является целью наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляева М.И., Зоткина Н.Л., Винтер В.Г. // Биохимия. - 1970. - Т. 35. - С. 409-413.
2. Винтер В.Г., Беляева М.И., Зоткина Н.Л. // Биохимия. - 1974. - Т. 39. - С. 923-928.
3. Абрамова З.И., Зоткина Н.Л., Белова М.М., Хамидуллина Н.Г., Винтер В.Г. // Цитология. - 1988. - Т. 30. - С. 349-353.
4. Аскарова А.Н. // Автореф. канд. дисс. - 1987.
5. Köhler G., Milstein G. // Eur. J. Immunol. - 1976. - v.6. - P. 511-519.
6. Келлер Дж. / В кн.: Иммунология. Методы исследований. // М.: Мир, 1983. - С. 321-324.
7. Laskowsky M., Seidel L. // Arch. Biochim. Biophys. - 1945. v. 7. - P. 465.
8. Новохатский А.С., Малахова И.В., Михеева Т.Г. // Вирусология. - 1985. - Т. 30. - С. 602-608.
9. Руослахти Э. / Иммуносорбенты в очистке белков // М.: Медицина, 1979. - С. II-18.

10. Notton B.A., Fido R.J., Galfe G. // *Planta*. - 1985. - V. 165. - P. 114-119.
11. Stähli Gh., Staechelin Th., Miggiano V., Shmidt J., Harring P. / *Hybridoma technology with special reference to parasitic diseases*. - 1979. - P. 53-62.
12. Дейл Е.И., Дэвид Г.М., Бетти Д., Тэттью Д.Ш. / В кн.: Моноклональные антитела // М.: Медицина, 1983. - С. 23.

ПРИБОРЫ И УСТРОЙСТВА ГАМЕТНО-КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ

Н.Р.Берман, В.И.Баранов, С.А.Розенфельд, Г.А.Кирбнев, В.П.Патерило

Центр автоматизации научных исследований и метрологии
АМН МССР, г. Кишинев

Расширение объема использования генной и клеточной инженерии для нужд фундаментальной биотехнологии связано с привлечением новых, в основном нелинейных, физических эффектов и разработкой на их основе нетрадиционных технических решений. Предметом анализа являются либо молекулярные ансамбли, либо популяции малоразмерных биологических объектов (МБО) таких, как, например, клеточные наборы или пыльца цветковых растений. В основе использования вычислительной техники и больших информационно-вычислительных систем лежат физико-механические методы экспрессного определения биологически значимых параметров, оценки и разделения смесей и популяций. Состав и структура аппаратного оснащения предназначены для расширения методов и средств исследования физико-механических свойств МБО, выявления коррелятивных зависимостей между этими свойствами и показателями биологической ценности, осуществления комплекса физических воздействий. Характерно, что в большинстве приборов и устройств целевое назначение реализуется многоступенчато, причем в качестве предварительной операции выступает "гомогенизация" состава МБО, производимая либо посредством фракционного выделения, либо путем искусственного придания отдельным классам свойств, удобных для дальнейшей обработки. Новые технические и конструктивные решения исходят из анализа физических и математических моделей, по-

звolyающих обойти принципиальную невозможность прямого измерения биохимических или иных характеристик биологического плана. В этом случае процесс измерения заменяется формализованной оценкой качества, распределением МБ0 в подклассы по характеру реакции на всевозможные физико-механические воздействия.

Как правило, свойства МБ0 как в препаративных, так и в аналитических целях выявляют по их индивидуальному или коллективному поведению в потоках, искусственно создаваемых двухфазных средах на газообразной или жидкостной основе. Дифференциация взаимодействия частиц с базовым течением, приводящая к их фракционному разделению - принцип работы серии устройств для аэродинамической сепарации пылицы и других МБ0.

Исследование упрощенных математических моделей позволило классифицировать некоторые возможные типы фракционирования. Наиболее традиционным является разделение по скорости витания в восходящем воздушном потоке; разделительным параметром служит скорость витания, выделяются три класса частиц: а) $v=v_B$; б) $v < v_B$, и в) $v > v_B$. Скорость витания является, видимо, одно-значной функцией лобового сопротивления движению или, иными словами, некоторых глобальных морфологических структур, проявляющихся при определении пространственной ориентации пыльцевого зерна относительно воздушного потока. Отражением коллективных свойств ансамбля МБ0 является фракционирование в дивергентно-включенном потоке; для достаточно тяжелых частиц распыление МБ0-облака происходит, в основном, в соответствии с распределением значений разделительного параметра ρv , т.е. по усредненной плотности частицы. В воздушных потоках, имеющих горизонтальную составляющую, легкие МБ0, содержащие компоненты ощутимо различной плотности, в т.ч. внутренние полости, сепарируются в зависимости от отношения подъемной силы к силе сопротивления движению в соответствующем направлении. Наибольший интерес представляет новый метод биологоспецифического фракционирования по выпадению из воздушного потока. Этот метод основан на использовании обнаруженного одним из нас физического эффекта "траекторного срыва". Суть этого эффекта состоит в том, что при нелинейном взаимодействии МБ0 со специально организованным воздушным потоком в движении

отделяемых частиц возникает неустойчивость, в результате чего они подкидают регламентированные траектории, после чего прекращают движение. Очевидно, что пространственная ориентация МБО определяется геометрией частицы и распределением плотности внутри ее объема. Поведение частицы в потоке переменной скорости зависит от общей массы и взаимодействия с соседями, а к потере устойчивости приводит не только диссиметрия, но и специфические упруго-пластические деформации. Для пылевого зерна траекторные срывы связаны также с локальной поверхностной структурой, в частности с наличием шипов, характером апертур, т.е. со скульптурными особенностями.

Для фракционирования кукурузной пыли разработана серия установки вертикального и горизонтального типов, отличающихся характером воздушных потоков и конструкцией сепарационных камер. Экспериментальные образцы выполнены в настольном и переносном вариантах. Характерной особенностью этих установок является агрегатированный принцип построения. В некоторых из них изменение архитектуры достигается путем использования сменных оконечных или наращивания числа срединных секций различной конфигурации. При необходимости производится комплектование дополнительными сервисными устройствами, обеспечивающими минимизацию грубых физических воздействий на МБО. Предусмотрена возможность комплексного многоступенчатого и мультиполевого фракционирования, а также совмещение с некоторыми другими технологическими процессами. Последние инженерные проработки узлов ввода исходного материала, разгрузочных устройств, конструкций сепарационных и осадительных камер, блоков создания и регулирования воздушных потоков, позволили провести их унификацию и осуществить макетное проектирование агрегатированной установки многоцелевого назначения, обладающей высокой степенью перенастраиваемости и реализующей указанные технологические процессы в комплексе.

Испытания, проведенные на различных модельных объектах, на свежесорванной кукурузной пыли и пыли прошлых сборов, выявили достаточно сильную корреляцию между отдельными фракциями и показателями биологической ценности. Так, удельное содержание легкорастворимых белков без учета их гидратации меняется почти до 3-х раз при переходе от одной фракции ку-

кукурузной пыльцы к другой. В селекционном эксперименте опыление пыльцой разных фракций приводило к различию в озерненности кукурузного початка на 60-80 %.

Микродозирование пыльцы и других МБО, в т.ч. по количеству зерен - важный элемент селекционного процесса на этапе гаметного отбора. Предварительные исследования показали невозможность использования наличных технических решений в связи с неприемлемыми воздействиями на дозируемый объект. Выяснилось, что повышение точности "числового" дозирования требует, по крайней мере, двухступенчатого технологического процесса. Предварительное направленное разделение пыльцевой популяции на классы по заданному признаку делает возможным непосредственное дозирование унифицированных подпопуляций, что имеет определенный биологический смысл. Нами обнаружено (Берман Н.Р.), что при захвате пыльцы вихрями турбулентного воздушного потока с ее последующей прогонкой через систему узких каналов движение пыльцевых зерен принимает колебательный характер. Возникают разрывные (релаксационные) колебания, в активной фазе которых через концевой канал происходит дозированный выброс пыльцевой массы. Пороговые значения массы регулируются углом атаки и углом скрещивания проходных каналов, запирающими свойствами канала, связанными с отношением его поперечных размеров к миделевому размеру частицы и временем достижения наиболее плотной упаковки частиц при их накоплении в начальном канале. Описанный эффект пульсирующего истечения пыльцевоздушной струи ложится в основу проектирования микродозаторов нового типа.

Установка локального воздействия на соцветие растений предназначена для микроклиматического воздействия факторами температуры и влажности воздуха в камере на размещенное в нем соцветие растения. Микроклимат в камере обеспечивается термостатированием камеры жидким теплоносителем с одновременным продуванием рабочего объема камеры воздухом заданной влажности при температуре теплоносителя. Для обеспечения работы с соцветиями разных типов предусмотрены сменные камеры разных размеров и конструкции. В камере могут размещаться, помимо соцветий, листья, плоды или отдельные части растений, а также небольшие растения целиком. Камера присоединена к установ-

ке гибкими шлангами и закрепляется на штативе, что позволяет устанавливать ее в удобном положении для исследователя и даже размещать в отдельном боксе. Установка предусматривает регулирование и автоматическое поддержание температуры теплоносителя (и, соответственно, воздуха), регулирование и автоматическое поддержание влагосодержания воздуха, регулирование и контроль расхода воздуха.

Расход воздуха через камеру регулируется в пределах от 0,02 до 1,2 м³/4, наименьшее влагосодержание воздуха 3,37 г/м³, наибольшая относительная влажность воздуха составляет от 80 до 95 % в диапазоне рабочих температур в камере от +5° до +50°C.

Установка для выращивания культуры клеток предназначена для обеспечения микроклимата, заданного программой, путем автоматического управления температурой в помещении и световым режимом на полках технологических стоек. Установка включает комплект технологических стоек для размещения сосудов с культурой клеток (по три полки в стойке) и шкаф управления. Размеры полки 1325х600 мм, освещенность полки - панель из 6 ламп ЛБ-40 с регулировкой высоты установки над полкой. Температура в помещении обеспечивается работой устанавливаемых в нем бытовых кондиционеров, связанных со шкафом управления, и системой воздухообмена (потолочные вентиляторы или циркуляционная система вентиляции).

Установка для культивирования клеток и тканей с контролем ионного состава предназначена для автоматизации исследований изменений ионного состава культуральных сред, связанных с метаболизмом биологических объектов. Установка предусматривает регистрацию результатов измерений с помощью измерительно-вычислительных комплексов. Установка включает: блоки культуральных сосудов, блок контрольных сосудов, измерительные блоки, блок управления, соединенные между собой и с циркуляционным насосом. Ион-селективные электроды, установленные в измерительных блоках соединены с коммутатором и далее с ИВК. В работе установки предусмотрены режимы измерений, контроля и калибровки электродов.

Десятикассетный термостат предназначен для термостатирования пыльцы или других МБО в металлических контейнерах, размещенных в рабочих объемах жидкостных термостатов при десяти

последовательных фиксированных значениях температур от 0°C до 54°C через каждые 6° . Размещение пыльцы в контейнерах предусмотрено в двух вариантах: на предметных стеклах в чашках Петри и в бумажных мешочках размерами $50 \times 30 \times 6$ мм. В кассету помещают либо до 3-х чашек Петри, либо до 20 бумажных мешочков. Установка состоит из высокотемпературной и низкотемпературной секций. Высокотемпературная секция включает в себя пять индивидуальных жидкостных термостатов, а в низкотемпературной один из них заменен на ультракриостат, настроенный на температуру 0°C в рабочем объеме. Рабочая жидкость прокачивается через систему змеевиков, объединяющих низкотемпературную секцию в единый блок.

В основу работы экспериментального образца установки для электропарации клеток положен принцип зарядки накопительного конденсатора постоянным током и его последующего разряда при достижении заданного напряжения. Для стабилизации параметров импульса и снижения влияния параметров среды, в которой находятся клетки, применено шунтирование разрядной ячейки. Разрядный импульс имеет экспоненциальную форму и фиксированную длительность порядка 10 мс. Амплитуда импульса регулируется в пределах 150-1500 В с одновременным контролем на цифровом индикаторе.

Установка укоренения регенерантов предназначена для выращивания регенерантов в почве в процессе их адаптации к условиям влажности окружающего помещения.

Условия эксплуатации: температура воздуха $20-30^{\circ}\text{C}$, относительная влажность 60-80 %, освещенность до 2 клк. Размер установки - $540 \times 140 \times 480$ мм, вес сухой установки - 6 кг, с почвой - 12 кг, превышение внутренней температуры над температурой окружающей среды не более 2°C . Обеспечивается измерение температуры и влажности воздуха во внутреннем объеме, а также дискретное регулирование последней.

В устройстве для размораживания спермы реализован принцип непрерывного удаления фазовопревращенного слоя из зоны плавления. Это обеспечивает минимизацию температурных градиентов в широком диапазоне темпов нагрева.

Другим проблемным вопросом является усовершенствование и развитие методов и средств электрофореза.

Усовершенствование имеющихся электрофоретических установок для проведения изоэлектрофокусирования связано с необходимостью нейтрализовать объемные заряды, вызывающие отслоение геля. Перспективным представляется использование эффекта "траекторного срыва" для конформационного разделения макромолекул в многокоординатном фракционировании.

ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ПРОГЕСТЕРОНУ

А.Э.Валдманн, А.-В.Н.Микельсаар

НИИОМП Тартуского госуниверситета, Тарту

Целью настоящей работы является создание гибридом, синтезирующих моноклональные антитела (МКА) к прогестерону для разработки нерадиологических методов его количественного определения в биологических жидкостях.

С этой целью проведен ряд опытов гибридизации, некоторые результаты которых приводятся в данной работе. Работа выполняется в рамках программы СЭВ 5.2.3.2.2.

Иммунизация мышей проведена по двум схемам [1] введения антигена II α -гидроксипрогестерона-II-гемисукцината с бычьим альбумином (Sigma) (табл. I).

Слияние проведено по слегка модифицированному методу Harwell и др. [2] в присутствии ПЭГ 4000 (Merck).

Продукцию МКА гибридомами тестировали либо методом точек на 96-луночных фильтрационных пластинках NATF 0,45 мкм (Millipore), либо Dot-методом на нитроцеллюлозных фильтрах 0,22 мкм, либо методом ИФА на 96-луночных пластинках для иммуно-тестирования (Nunc). Клонирование вежи методом конечных разведений.

Характеристика МКА. Классы иммуноглобулинов определяли Dot-методом на нитроцеллюлозных фильтрах, субклассы по методу ИФА на микротитрационных пластинках (Titertek).

Перекрестную реактивность определяли по методу конкурентного ИФА, вычисление процента перекрестной реакции осуществляли с помощью компьютерной программы 'Cross-ELISA', разработанной нашим сотрудником М.Вийкмаа [3].

Таблица I

Методы иммунизации

Время до слияния	Количество антигена в мкг	Способ введения антигена
<u>Кратковременная иммунизация</u>		
15 дней	50 (ПАФ, ФБР 1:1)	в.б.
8 дней	50 (ПАФ, ФБР 1:1)	в.б.
3 дня	400 (ФБР)	в.б.
2 дня	200 + 200 (ФБР)	в.б. + и.в.
1 день	200 + 200 (ФБР)	в.б. + и.в.
<u>Длительная иммунизация</u>		
4 месяца	100 (ПАФ, ФБР 1:1)	в.б.
3 месяца	100 (ФБР)	в.б.
2 месяца	100 (ФБР)	в.б.
1 месяц	100 (ФБР)	в.б.
3 дня	100 (ФБР)	в селезенку

ПАФ - полный адъювант Фрейнда

в.б. - внутрибрюшинно

ФБР - фосфатный буферный раствор

и.в. - интравенозно

Таблица 2

Результаты трех опытов гибридизации

Слияние	Иммунизация	Количество стабильных гибридом	Классы и субклассы МКА
I	кратковременная	10	9 IgG1 1 IgG2b
II	кратковременная	4	1 IgG1 1 IgG3 2 IgM
III	длительная	1	1 IgG2b

Из таблицы 2 видно, что три гибридизации дали 15 стабильных гибридомных линий, продуцирующих МКА к прогестерону, из них 10 субкласса IgG1, 2 - IgG2b, 1 - IgG3 и 2 - IgM. Одно антитело (Pro6-6C2) тщательно исследовано на перекрестные реакции к ряду других стероидов (табл. 3).

Таблица 3
Перекрестные реакции МКА Pro6-6C2 со стероидами

Стероиды	Степень перекрестных реакций, %
прогестерон	100
5β-прегнан-3,20-дион	157,7
5α-прегнан-3,20-дион	9,4
5β-прегнан-3α,20α-диол	0
5α-прегнан-3α,20α-диол	0
5β-прегнан-3α,20β-диол	0
5α-прегнан-3β,20β-диол	0
5α-прегнан-3β-ол-20-он	15,2
прегненолон(5-прегнен-3-ол-20-он)	2,4
17α-гидроксипрогестерон	31,6
17α-гидроксипрегненолон	0
прогестерон-3(0-карбоксиметил)-оксим	28,8
11α-гидроксипрогестерон II-гемисукцинат	43,3
11α-гидроксипрогестерон	33,8
18-гидроксипрогестерон	0
16α-гидроксипрогестерон	0
19α-гидроксипрогестерон	28,2
11β-гидроксипрогестерон	10,1
эстрадиол	0
эстрон	0
17α-эстрадиол	0
β-эстрадиол	0
16-эпиэстриол	0
эстриол	0
дезоксикортикостерон	2,4
кортикостерон	0
гидрокортизон	0
андростендион	3,2
5α-андростендион	2,8
эпиандростерон	0
андростерон	5,9
дегидроэпиандростерон	2,9
5β-андростандион-3,17(этиохолан-3,17-дион)	24
этиохоланолон	85
5α-дигидротестостерон	0
тестостерон	0
RU-5020	0
ORG-2058	0
медроксипрогестерон	0

МКА Pro6-6C2 испытывали для определения прогестерона в молоке коров по методу конкурентного ИФА. На рис. 1 дана калибровочная кривая. Данные обработаны по программе линейного регрессионного анализа на микрокомпьютере Apple II, разработанной М.Вийкмаа.

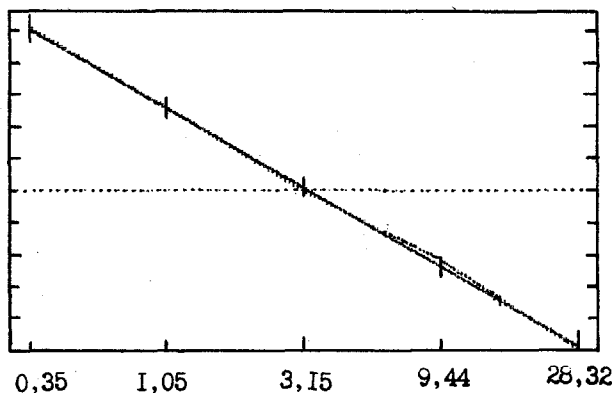


Рис. 1. Калибровочная кривая определения прогестерона. На оси ординат - logit -единицы отношения ферментативной активности связанной фракции, полученной в присутствии конкурента (B), к активности фракции, связанной в отсутствии конкурента (B_0) - $\ln(B/(B_0 - B))$. На оси абсцисс - возрастающие log -концентрации стандартного антигена (в нг/мл).

Начаты исследования эффективности использования разработанной диагностической системы в сельскохозяйственной практике для определения стельности у коров.

ЛИТЕРАТУРА

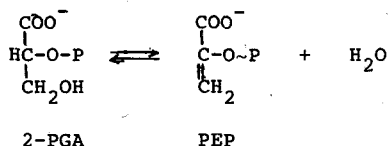
1. Cianfriglia M., Mariani M., Armellini D. et al. // *Methods in Enzymol.* - 1986. - V. 121. - P. 193-210.
2. Harwell L.W., Bolognino M., Bidlack J.M. et al. // *J. Immunol. Methods.* - 1984. - V. 66. - P. 59-67.
3. Вийкмаа М.Г., Микельсаар А.-В.Н., Юронен Э.И. / Генная и клеточная инженерия в решении фундаментальных проблем биотехнологии. - Тарту: Тартуский госуниверситет, 1989. - Т. 2. - С. 23-32.

ТВЕРДОФАЗНЫЙ "СЭНДВИЧ" ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЭНОЛАЗЫ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИД- КОСТИ С ПРИМЕНЕНИЕМ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Я.С.-В.Казесалу, К.К.Мёллер, С.Ю.Халдре, А.О.Пийрсоо

НИИОМП Тартуского госуниверситета, Тарту

Энолаза (2-фосфоглицерат-гидратаза, ЕС 4.2.1.1.) является энзимом гликолитического пути, катализирующим обратимую реакцию между 2-фосфоглицератом (2-PGA) и фосфоэнолпируватом (PEP).



Образовавшийся продукт фосфоэнолпируват является высоко-энергетическим соединением, фосфорильная группа которого может быть легко перенесена на ADP со следующим превращением в АТФ.

Энолаза состоит из двух субъединиц, которые определены тремя независимыми структурными генами - α , β и γ . В разных тканях человека найдены 5 из шести возможных комбинаций двух субъединиц - $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, $\beta\beta$ и $\gamma\gamma$.

Наиболее широко распространен $\alpha\alpha$ -изозим, который локализуется почти во всех тканях [1]. Поскольку в мозге данный изозим содержится только в клетках глии, он назван ненейральной энолазой (ННЭ). $\gamma\gamma$ -энолаза, которая локализована прежде всего в нейронах головного мозга, названа нейроспецифической энолазой (НСЭ) [2]. Гибридная форма, $\alpha\gamma$ -энолаза, характерна для клеток нейроэндокринной ткани [3], а $\beta\beta$ - и $\alpha\beta$ -изоформы найдены, соответственно, в скелетно- и сердечномышечной ткани [4].

НСЭ является растворимым кислотным белком, состоящим из двух идентичных γ -субъединиц с суммарной молекулярной массой 78000 Д и рI 4,7 [2].

Локализация НСЭ ограничена клетками нейральной системы, ее концентрация в спинномозговой жидкости (СМЖ) и в сыворотке крови незначительна (до 5 нг/мл). Из литературы известно,

что НСЭ является хорошим маркером повреждения нейральной ткани, так как в этих случаях ее концентрация в СМЖ и сыворотке резко увеличивается.

Учитывая вышесказанное и то, что одним из наиболее перспективных направлений клинической диагностики является иммуноферментный анализ, нами разработана методика количественного иммуноферментного определения НСЭ в СМЖ с использованием моноклональных антител (МКА).

Материал и методика

Головной мозг человека, используемый для выделения НСЭ, был получен через сутки после смерти пациента и хранился при температуре -20°C . Выделение НСЭ из гомогената головного мозга человека проводили с помощью жидкостной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе по методу [5].

В полученных чистых белковых фракциях энзимную активность определяли прямым спектрофотометрическим методом в буфере pH 8,0, содержащем 25 мМ MgCl_2 . Скорость роста концентрации фосфоэнолпирувата была определена по росту абсорбции при 240 нм.

Очищенным препаратом НСЭ иммунизировали мышей линии BALB/c. Гибридомы, продуцирующие МКА к НСЭ получены по общепризнанной методике [6] при использовании в качестве миеломы мышиных клеток линии РА1. Всего получено 9 стабильных линий гибридом, продуцирующих МКА к НСЭ. Специфичность полученных МКА определяли методом иммуноблоттинга.

На основе очищенных МКА создали тест-систему определения концентрации НСЭ в СМЖ. В основу системы положена "сэндвич-ELISA" методика.

Количественное определение НСЭ проводили по следующей схеме:

1. На поверхности лунок полистироловой пластинки (Nunc) фиксировали 200 мкл МКА ЕНО 2 2Н5 с концентрацией 30 мкг/мл в течение 24 часов при 4°C .

2. Пластинки отмывали ЗФР 3 раза.

3. Пластинки блокировали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина в ЗФР 6-7 часов при комнатной температуре.

4. Пластинки отмывали ЗФР 3 раза.

5. На две крайние левые полосы пластинки наносили стан-

дартные растворы НСЭ с концентрацией от 0 до 500 нг/мл по 100 мкл в каждую лунку. В остальные лунки наносили пробы СМЖ в двух повторах.

6. В каждую лунку добавили по 100 мкл МКА ЕНО 3 8a10.G1, конъюгированного с пероксидазой, и инкубировали при 4° С 12 часов.

7. Пластины отмывали ЗФР 3 раза.

8. В каждую лунку вносили по 200 мкл свежеприготовленного раствора субстрата (0,5 % о-фенилендиамина и 0,01 % H_2O_2 в цитратфосфатном буфере, pH 5,0). Инкубация 30 минут при 37° С в темноте.

9. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 12,5 % серной кислоты.

10. Интенсивность реакции в лунках оценивали по оптической плотности при 490 нм с помощью фотометра Microelisa Auto Reader MR 580 (Dynatech). Данные обрабатывались на персональном компьютере Apple II.

Результаты

На основе полученных нами моноклональных антител, специфических к НСЭ человека, разработана методика иммуноферментного анализа типа "сэндвич" для определения НСЭ в СМЖ.

Количественный анализ содержания НСЭ в СМЖ провели у 35 лиц контрольной группы и у 224 пациентов с разными неврологическими заболеваниями. В составе контрольной группы изучена СМЖ пациентов, болезни которых не были связаны с повреждением нервной системы. Ведущим симптомом у них был радикулит.

У пациентов контрольной группы содержание НСЭ в СМЖ повышалось до 5 нг/мл, а в среднем составляло 2,3 нг/мл. Эти данные совпадают с величинами известной в литературе нормы НСЭ [7,8].

Статистически достоверного повышения содержания НСЭ не наблюдалось и у пациентов с сотрясанием мозга (среднее значение НСЭ 3 нг/мл), с головной болью (1,5 нг/мл).

У 21 пациента из 25 больных гнойным менингитом (84 %) уровень НСЭ был повышен и колебался в пределах от 8 до 458 нг/мл. Измерение концентрации НСЭ в динамике у пациентов с гнойным менингитом (4 пациента) показывает, что в течение длительно-

го времени уровень НСЭ остается высоким (табл. I).

Таблица I
Динамика концентрации НСЭ в СМЖ пациентов
с гнойным менингитом

Пациент	Число	Концентрация НСЭ нг/мл
I	25.02.1988	21
	26.02.	24
	03.03.	73
	04.03.	51
	06.03.	54
2	04.12.1987	48
	26.01.1988	45
	03.02.	38
	08.02.	38
3	17.02.1988	42
	23.02.	62
	25.02.	44
4	23.01.1988	458
	26.01.	261
	12.02.	28

Концентрацию НСЭ определяли и у 74 пациентов с инфарктом головного мозга. Уровень энзима был выше нормы у 23 из них (31 %) и достигал 139 нг/мл, составляя в среднем 22,9 нг/мл (рис. I). При внутримозговом кровоизлиянии количество НСЭ в СМЖ было повышено у 11-ти пациентов из 14-ти (78,5 %) и колебалось от 7 до 155 нг/мл, в среднем 33,4 нг/мл.

Наша тест-система позволяет довольно точно (2 нг/мл) и с небольшой затратой времени определять концентрацию НСЭ в СМЖ человека. Полученные данные могут дать информацию о том, сопровождается ли конкретное заболевание повреждением нейронов и каковы его величины, а следовательно уточнить и диагноз. Открывается возможность и наблюдения за ходом болезни и эффективностью лечения.

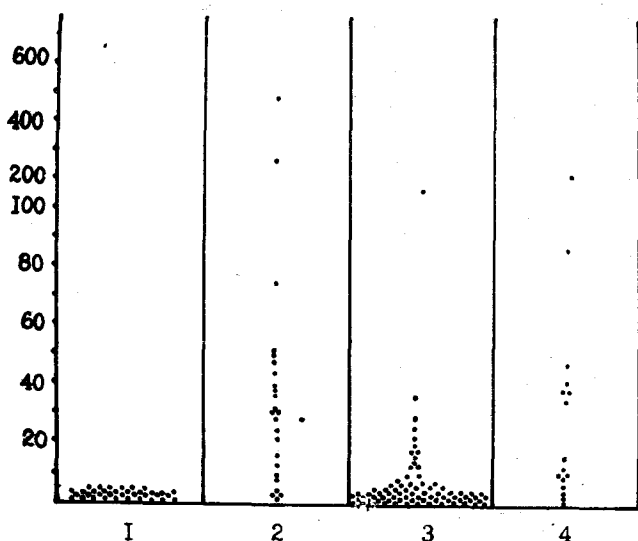


Рис. I. Распределение концентрации НСЭ в СМЖ пациентов.
 I - контрольная группа; 2 - гнойный менингит;
 3 - инфаркт головного мозга; 4 - внутримозговое кровоизлияние.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schmechel D., Maragnos P.J., Zis A.P. // Science. - 1978. - V. 199. - P. 313-314.
2. Bock E., Fletcher L., Rider C.C., Taylor C.B. // J. Neurochem. - 1978. - V. 30. - P. 181-185.
3. Jorgenson O.S., Centervall G. // J. Neurochem. - 1982. - V. 39. - P. 537-545.
4. Kato K., Shimizu A., Semba R., Satoh T. // Biochim. Biophys. - 1985. - V. 841. - P. 50-58.
5. Thompson R.J., Graham J.G., McQueen I.N. // J. Neurol. Sci. - 1980. - V. 47. - P. 241-254.
6. Köhler G., Milstein C. // Nature. - 1975. - V. 256. - P. 495-497.

7. Hay E., Royds Y.A., Davies-Jones G., Lewtas N.A., Timperley W.R., Taylor C.B. // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. - 1984. - V. 47. - P. 724-729.
8. Parma A.M., Maragnos P.J., Goodwin F.K. // J. Neurochem. - 1981. - V. 36. - P. 1093-1096.

ПРОДУЦИРОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К α_2 -ИНТЕРФЕРОНУ
ЧЕЛОВЕКА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ГИБРИДОМЫ

Л.В.Кухарева, И.А.Дьяконов, М.И.Блинова, Н.С.Николаенко,
Г.П.Пинаев

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

В биотехнологии должны одновременно оптимальным образом сочетаться возможность синтеза культивируемыми клетками биологически активных веществ и способ получения наибольшего количества такого продукта. В настоящее время этому требованию, вероятно, более всего отвечают клетки гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела (МКА), в сочетании с крупномасштабным культивированием их в иммобилизованном состоянии [3,6].

Иммобилизация клеток животных предполагает заключение их в гранулы из пористого полимерного геля или в полупроницаемую полимерную мембрану - капсулу, через стенки которой могут проходить метаболиты, выделяемые клеткой, и низкомолекулярные вещества. Преимущества культивирования в иммобилизованном состоянии: механическая защищенность клеток с тонкой клеточной оболочкой, увеличение плотности культивируемых клеток в 10-100 раз по сравнению с традиционными способами культивирования в суспензии или монослое, концентрирование продуктов синтеза клетки.

Результатом нашей работы явилось установление возможности продуцирования МКА к α_2 -интерферону человека клетками мышиной гибридомы, иммобилизованными в гранулы агарозы.

Материал и методы. В работе использована мышиная гибридома, продуцирующая МКА к α_2 -интерферону человека, клон 2I8/15, полученная в Отделе клеточных культур Института цитологии АН СССР. Для культивирования этих клеток использована среда без сыворотки, представляющая собой смесь среды DME (среда Игла

в модификации Дальбекко) и среды F12 в соотношении 1:1 с добавками инсулина, трансферрина, этаноламина и селенита натрия.

Клетки были иммобилизованы в гранулы из агарозы (Sigma, тип VII) по методу Нильссона и соавт. [4]. Гранулы получали путем диспергирования в масляной фазе (медицинское вазелиновое масло) смеси клеток с 0,6 % раствором агарозы.

Клетки контрольного варианта культивировали в суспензии в матрасах или сосудах Колля объемом 20-50 мл; начальная плотность суспензии составляла от 5 до $8,5 \times 10^6$ клеток в объеме 8 мл ростовой среды (объем среды и количество клеток в контроле каждого опыта составляли примерно 1/6 объема и количества клеток опытного варианта).

Клетки опытного варианта (иммобилизованные) культивировали в 50 мл ростовой среды в сосудах на 500 мл. Плотность клеток в сосуде составляла от 27 до 48×10^6 клеток. В отличие от контрольного варианта сосуды с иммобилизованными клетками в процессе культивирования находились на качалке, поскольку встряхивание препятствовало оседанию гранул на дно сосуда. В каждом опыте ежедневно производили смену среды.

Всего для определения способности продуцирования МКА клетками гибридомы нами было поставлено 5 опытов. Сроки культивирования клеток в разных опытах составляли от 8 до 21 дня. Максимальные сроки культивирования клеток в контроле 5-14 дней, в опыте (иммобилизованные клетки) до 21 дня (до момента прекращения опыта).

Жизнеспособность и состояние контрольных и иммобилизованных клеток в процессе культивирования оценивали методом цитофлуориметрии ДНК после окрашивания клеток ядерным красителем Hoechst 33258 по интенсивности свечения ядер в люминесцентном микроскопе "Люмам", пользуясь фотоумножительной приставкой к нему. Кроме того клетки контрольного варианта дополнительно окрашивали трипановым синим и подсчитывали время от времени количество живых клеток.

Присутствие МКА, продуцируемых клетками гибридомы, определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа в пробах, взятых из ростовой среды после культивирования в ней клеток.

Материал для биохимического и цитологического анализов брали ежедневно в момент смены среды. Из контрольной суспен-

зии брали по 0,1-0,2 мл суспензии клеток для окрашивания трипановым синим и Hoechst 33258, затем всю остальную суспензию переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали. Среду-супернатант использовали для анализа на присутствие МКА, а к осадку клеток добавляли свежую среду, мягко пипетировали и продолжали дальнейшее культивирование. В опытном варианте сосуда с иммобилизованными клетками в гранулах снимали с качалки, давали гранулам осесть на дно и затем с помощью пипетки пытались максимально удалить среду (из нее же брали и пробу для определения МКА), после чего добавляли свежую среду и продолжали культивирование.

Результаты и обсуждение. На протяжении всего срока культивирования жизнеспособные клетки из контрольного варианта оставались без изменения (рис. 1), в то время как иммобилизованные клетки увеличивались в размерах (рис. 2), о чем можно было достоверно судить кроме визуального наблюдения по результатам микрофотоирования окрашенных Hoechst 33258 клеток. Это же полностью соответствовало полученным нами ранее данным [1,2]. По мере культивирования в контроле происходило уменьшение количества жизнеспособных клеток, в то время как в иммобилизованном состоянии подавляющее большинство клеток продолжало существовать и функционировать.

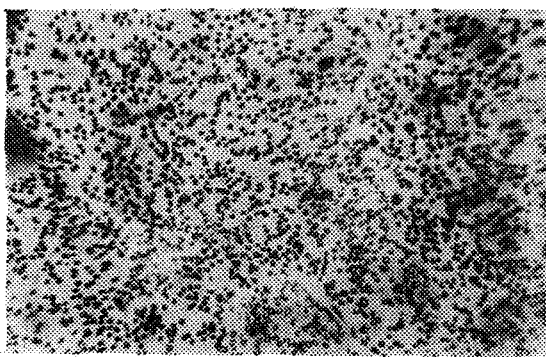


Рис. 1. Клетки гибридомы, культивируемые в суспензии (контроль; 5 дней культивирования).

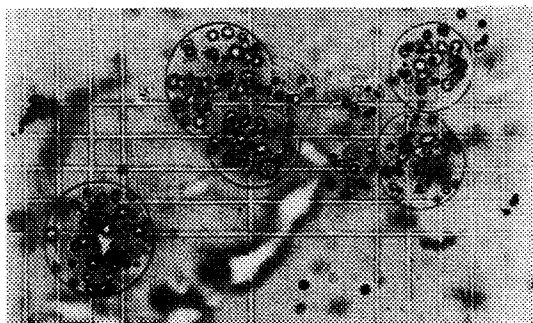


Рис. 2. Клетки гибридомы, иммобилизованные в гранулы агарозы (опыт; 7 дней культивирования).

Количественное определение продуцирования клетками МКА проводили в ростовой среде после культивирования клеток, предварительно сделав калибровку по иммуноглобулину, выделяемому клетками клона 2I8/I5. Результаты представлены на графике (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют, что продуцирование МКА происходит постоянно в течение всего срока культивирования как в контроле, так и в опыте. По нашим данным количество продуцируемого иммуноглобулина в контрольных клетках выше, чем в иммобилизованных. Хотя по мере культивирования (после 10 дней) может происходить выравнивание, но это скорее всего за счет постепенной гибели контрольных клеток, которые ни разу не пересевали в течение культивирования.

Меньшее количество продукта в опыте по сравнению с контролем может быть обусловлено потерями – потерей части гранул с клетками при иммобилизации, которая составляет около 15 %; прилипанием части гранул к стенкам сосуда во время культивирования, так как сосуды не силиконизировали, а клетки в этих гранулах соответственно погибают; потерей при ежедневной смене среды и взятии проб для цитологического анализа. Возможно следует ожидать примерно равного продуцирования МКА в опыте и контроле.

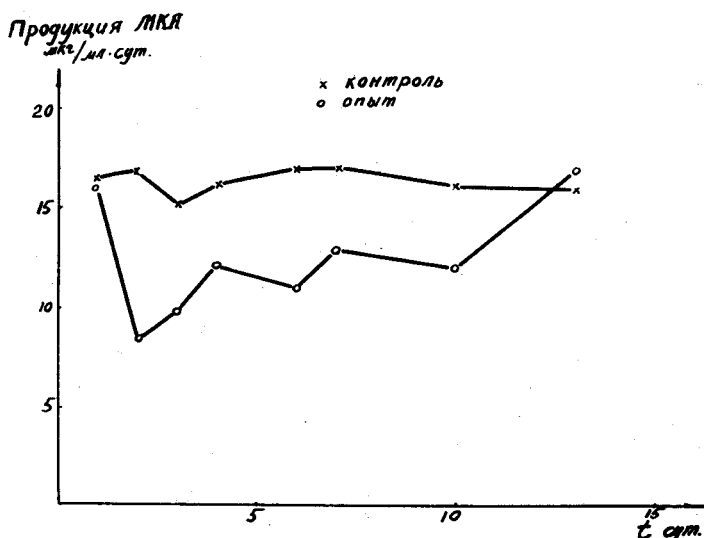


Рис. 3. Продукция МКА клетками гибридомы мыши к α_2 -интерферону человека, включенными в агарозный гель.

Как отмечается в других работах, количество продукта, синтезируемого иммобилизованными в агарозу клетками, например, интерлейкина лимфобластоидными клетками гиббона MLA-144, не превышает количества, которое может быть получено из нормальной суспензионной культуры [7]. Такие сведения сообщаются и по поводу продуцирования интерлейкина клетками гибридомы [5]. Но во всех этих работах, также как и в нашем случае, есть несомненное преимущество получения иммуноглобулинов с помощью иммобилизованных клеток, поскольку состояние иммобилизации увеличивает срок жизнеспособности культивируемых клеток и позволяет без ущерба увеличивать плотность клеток в среде.

Полученные нами результаты дают возможность считать, что клетки гибридомы, будучи иммобилизованными в агарозе, остаются живыми и способными все время культивирования продуцировать МКА к α_2 -интерферону человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кухарева Л.В., Дьяконов И.А., Блинова М.И., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П. // Цитология. - 1987. - Т. 29. - С. 1090.
2. Кухарева Л.В., Дьяконов И.А., Блинова М.И., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П. // Цитология, в печати.
3. Merten O.-W. // Trends Biotechnol. - 1987. - V. 5. - P. 230-237.
4. Nilsson K., Birnbaum S., Flygare S., Linse L., Schröder U., Jepsson U., Larsson P.O., Mosbach K., Brodelius P. // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1983. - V. 17. - P. 319-326.
5. Nilsson K., Schreier W., Merten O.-W., Östberg L., Lielh E., Katinger H.W.D., Mosbach K. // Nature. - 1983. - V. 302. - P. 629-630.
6. Nilsson K. // TИВТЕСН. - 1987. - V. 5. - P. 73-78.
7. Schreier W., Nilsson K., Merten O.-W., Katinger H.W.D., Mosbach K. // Develop. Biol. Standart. - 1984. - V. 55. - P. 155-161.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К 17 α -ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНУ

Р.А.-В.Микельсаар, А.-В.Н.Микельсаар

НИИОМП Тартуского госуниверситета, Тарту

Целью настоящей работы является создание гибридом, синтезирующих моноклональные антитела (МКА) к 17 α -гидроксипрогестерону для разработки нерадииологических методов его количественного определения в биологических жидкостях. С этой целью начаты опыты гибридизации, некоторые результаты которых приводятся в данной работе. Работа выполняется в рамках программы КР НТП СЭВ 5.2.3.2.2.

Иммунизация мышей линии BALB/c проведена по кратковременному методу введения иммуногена по Cianfriglia et al. [2] (табл. I). Иммуногеном служил конъюгат 17 α -гидроксипрогестерон-3-О-карбоксиметилоксиима с бычьим альбумином (Sigma).

Таблица I

Метод иммунизации (Cianfriglia et al., 1983; вариант А)

Дни до слияния	Количество антигена в мкг	Способ введения антигена
15	50 (ПАФ, ФБР 1:1)	в/б
8	50 (ПАФ, ФБР 1:1)	в/б
3	400 (ФБР)	в/б
2	200 + 200 (ФБР)	в/б + и/в
1	200 + 200 (ФБР)	в/б + и/в

ПАФ - полный адъювант Фрейнда

в/б - внутривенно

ФБР - фосфатный буферный раствор

и/в - интравенно

Слияние проведено по слегка модифицированному методу Harwell et al. [1]. Клонирование вели методом конечных разведений. Продукцию МКА гибридами тестировали либо методом точек на 96-луночных иммунофилтрационных пластинках NAT 0,45 мкм (millipore), либо Dot-методом на нитроцеллюлозных фильтрах 0,22 мкм (Schleicher & Schüll). На отдельные фильтры или на дно филтрационных пластинок наносили параллельно по две капли альбумина и иммуногена, оба в концентрации 1 мг/мл. Фильтры блокировали в растворе 0,08 % казеина в течение 30 мин, на фильтры воздействовали супернатантами гибридных клонов в течение 24 часов при 4° С, промывали трижды ФБР и связывание МКА с антигеном выявляли с козьими противомышными антителами, меченными пероксидазой. Субстратом для пероксидазы служил α-хлоронафтол. Те клоны, супернатанты которых реагировали только с иммуногеном, а не с альбумином, считали положительными и были подвергнуты дальнейшим манипуляциям.

Результаты одного удачного опыта гибридизации приведены в таблице 2.

Из показанных в ней положительных клонов (30), только 3 сохранили синтетическую способность (6Е3, G9 и 3D11). Клоны 6Е3 и G9 погибли из-за инфекции микоплазмой, клон 3D11 удалось спасти путем введения клеток в селезенку мыши BALB/c с последующим культивированием клеток из асцитной жидкости. В

Таблица 2

Результаты гибридизации

Клоны	Кол-во
Всего лунок	904
Всего первичных клонов	475
Клоны, подходящие для тестирования	359
Клоны, синтезировавшие МКА	81
Клоны, реагировавшие только с БСА	2
Клоны, реагировавшие как с БСА, так и с конъюгатом I7ОН-прогестерон с БСА	49
Клоны, реагировавшие только с конъюгатом I7ОН-прогестерона с БСА	30

результате этой процедуры удалось получить свободные от инфекции клетки, а также асцитную жидкость для дальнейшей работы с МКА. К настоящему времени клон 3D11 реклонирован и клетки хранятся в клеточном банке НИИОМП ТГУ.

Характеристика МКА. Для более детальной характеристики МКА 3D11, для изучения перекрестных реакций приготовлен конъюгат I7 α -гидроксипрогестерон-3-О-карбоксиметилоксиима с пероксидазой (нашим сотрудником Ю.Париком по методу Janovski et al. [3]). К данному времени установлено, что связывание 3D11 с иммуногеном ингибируется чистым I7 α -гидроксипрогестероном, но не тестостероном и прогестероном. Изучение специфичности антитела 3D11 продолжается.

ЛИТЕРАТУРА

1. Harwell L.W., Bolognino M., Bidlack J.M. et al. // J. Immunol. Methods. - 1984. - V. 66. - P. 59-67.
2. Cianfriglia M., Armellini D., Massone A., Mariani M. // Hybridoma. - 1983. - V. 2. - P. 451-456.
3. Janovski A.H., Shulman F.C., Wright G.E. // Steroids. - 1974. - V. 23. - P. 49-64.

ПАНЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ
 α -ИНТЕРФЕРОНАМ

И.Ю.Павлов, Л.Ф.Арапова, И.Н.Блинова, А.М.Пироваров,
Л.С.Изотова, А.Я.Стронгин, Ю.Я.Бундулис, В.В.Берзинь,
Л.П.Коробицын

ВНИИ особо чистых биопрепаратов, г. Ленинград,
ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов,
г. Москва, Институт органического синтеза, г. Рига

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к α -интерферону, проводили в два этапа. На первом этапе мышь линии BALB/c иммунизировали пять раз в течение 4 месяцев, вводя за весь цикл иммунизации около 150 мкг α A интерферона (α A-ИФН). Мышь была забита на 4 сутки после бустирования, 50 % выделенных из селезенки клеток были заморожены при -70° C. Использование замороженных спленоцитов позволило, не теряя времени на повторную иммунизацию, получить две стабильные гибридомы 5A6 и 5g4, продуцирующие МКА класса G₁. Эти линии были последовательно переведены в стеклянные флаконы, затем в роллеры и затем введены интраперитонеально мышам разных линий (DWA, BALB/c, CBA, C57/black и нелинейным). Гибридома 5A6 показала несколько лучшие ростовые возможности при пассировании на мышах и была выбрана в качестве основного производственного штамма. Параллельно с накоплением культуральной массы линии были заморожены в банке клеточных культур ИЦ АН СССР, а линия IBP5A6 депонирована как производственный штамм.

На втором этапе получения гибридом в качестве иммуногенов использовали гомогенный препарат α A-ИФН и рекомбинантный α -ИФН 90 % чистоты. Для получения гибридов извлекали из мышей селезенки и подколенные лимфоузлы. Слияния проводили для каждого источника иммуноцитов отдельно.

Группу мышей BALB/c иммунизировали в подушечки задних лап, вводя по 20 мкг α A-ИФН. Мыши были бустированы спустя три месяца после первой инъекции внутрибрюшинным введением смеси из 10 мкг α A- и 10 мкг α N-ИФН. Слияние 2 и 3 проводили соответственно на 4 и 5 дни после бустера. Соотношение иммуноцитов и миеломных клеток, число засеянных плат приведены в таблице I.

Таблица I

Характеристика проведенных гибридизаций

Параметры слияний	Номера слияний						
	I	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Срок между бустером и забором клеток, дни	3,5	3,5	3,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Источник иммуноцитов	сел	сел	лу	сел	лу	сел	лу
Количество иммунных клеток, млн	42	100	6	75	15	70	20
Миелома	Sp2/0	PAI	PAI	Sp2/0	Sp2/0	Sp2/0	Sp2/0
Количество миеломных клеток, млн	24	35	4	24	5	26	13
Отношение иммуноцит/миелома	1,8	3,0	1,5	3,0	3,0	2,5	1,5
Количество засеянных микроплат	12	7	1	4	1	4	2
Количество стабильных гибридом	2	9	1	1	0	1	0
Количество иммуноцитов на 1 стабильную гибридому, млн	21	11	6	75	-	70	-

Примечание: сел - селезенка; лу - лимфоузлы

Другую группу мышей BALB/c иммунизировали α N-ИФН. Каждой мыши ввели по 10 мкг антигена подкожно и по 10 мкг в подушечки задних лап. Спустя три месяца мышей бустировали введением 20 мкг α N-ИФН внутривенно. Слияние 4 проводили на 4-й день после бустера (табл. I).

В связи с отсутствием достаточных количеств α N-ИФН скрининг гибридов после слияний 2, 3, 4 проводили только в отношении α A-ИФН. Было получено 12 линий, специфических в отношении α A-ИФН; шесть из них продуцируют иммуноглобулины подкласса G₁, два - G_{2a}, четыре - G_{2b}. Данные по происхождению гибридом, определению изотипов, а также характеристики продуктивной стабильности приведены в таблице 2.

Как следует из данных, представленных в таблице I, наибольшая эффективность слияния достигнута в случае гибридизации лимфоузлов мыши с миеломой PAI: на 6×10^6 иммуноцитов по-

Таблица 2

Происхождение, стабильность, изотипирование
полученных линий

№ пп.	Название штамма	Номер слия- ния	Миелома	Порядковый № клонирования и соответствующий % пози- тивных клонов (№-%)
I.	5A6	I	Sp2/0	I-30, 2-60, 3-100
2.	5C4	I	Sp2/0	I-30, 2-90, 3-100
3.	AN1	2A	PAI	I-8, 2-70, 3-100
4.	A2	2A	PAI	I-50, 2-90, 3-100
5.	A3	2A	PAI	I-100, 2-100
6.	AN4	2A	PAI	I-100, 2-100
7.	A5	2A	PAI	I-5, 2-30, 3-100
8.	AN6	2A	PAI	I-18, 2-100
9.	A7	2A	PAI	I-90, 2-100
10.	A8	3A	Sp2/0	I-100, 2-100
11.	A9	2B	PAI	I-100, 2-100
12.	A10	2A	PAI	I-100, 2-100
13.	AN11	2A	PAI	I-90, 2-100
14.	NA12	4A	Sp2/0	I-11, 2-5, 3-60, 4-100

лучен I стабильный гибрид. Оптимальным сроком отбора иммунных клеток при иммунизации α -ИФН являются, по-видимому, четвертые сутки после бустирования; на пятые сутки выход целевых гибридом снижается (табл. I).

Таким образом, получены 14 гибридом, стабильно продуцирующих моноклональные антитела к α A-ИФН человека. Изучение специфичности полученных МКА было проведено с использованием различных вариантов иммуноферментного анализа. Схемы этих вариантов и полученные результаты приведены в таблице 3. В качестве антигенов использовали рекомбинантные α A, α N и β -интерфероны.

Ни одно из антител, включая поликлональные, не взаимодействует с рекомбинантным β -интерфероном. МКА A2, A3, AN6, AN11 и AN12 могут быть использованы в 2-х сайтовом тесте в tandem с МКА 5A6, являющимся продуктом промышленного гибридомно-

Таблица 3

Основные характеристики антител

Анти- тела	Изо- тип	αA		αN		β	Эпи- топ	№ сли- яния	Проис- хождение
		ИФА1	ИФА2	ИФА1	ИФА1				
5A6	I	+	-	+	-	A	A	I	I
AN1	"	+	-	+	-	A	A	2A	2
A2	"	+	+	-	-	B	B	2A	3
A3	"	+	+	-	-	B	B	2A	3
A4	"	+	-	+	-	A	A	2A	2
A5	"	+	+	-	-	B	B	2A	3
AN6	"	+	+	+	-	C	C	2A	4
A7	2A	+	-	-	-	D	D	2A	5
A8	"	+	-	-	-	D	D	3A	6
A9	2B	+	-	-	-	D	D	2B	7
A10	"	+	-	-	-	D	D	2A	8
AN11	"	+	+	+	-	C	C	2A	9
NA12	"	+	+	+	-	C	C	4A	10
NK2	I	+	-	+	-	A	A		
КрайФН	-	+	+	+	-				

ИФА1: ИНФ; МКА; анти МКА-Пх

ИФА2: МКА; ИНФ + 5A6-Пх

го штамма. Шесть МКА (AN1, AN4, AN6, AN11, AN12, 5A6), как и NK₂ и КрайФН способны связывать рекомбинантный αA -ИФН, иммобилизованный на твердую фазу. Сравнивая данные, характеризующие способность МКА связывать αN -ИФН, с одной стороны, и взаимодействие в тандеме с МКА 5A6, можно выделить 4 группы МКА, распознающих по крайней мере 4 различных эпитопа молекулы αA -ИФН (обозначенных в табл. 3 условно буквами А, В, С, Д).

Для разработки двухсайтового иммунометрического анализа αA -ИФН нами были выбраны МКА А3. Анализ проводили в два этапа: на микроплаты сорбировали МКА А3, спустя 1 час в ячейки вносили образцы αA -ИФН и одновременно конъюгат 5A6-Пх. Проведенный таким образом тест на αA -ИФН продемонстрировал наилучшие характеристики по сравнению с использованными ранее ва-

риантами иммуноферментного определения α A-ИФН. Чувствительность теста АЗ-ИФН-5А6-Пх достигала 0,1 нг/мл (20 МЕ/мл), диапазон измерения концентраций - от 0,1 нг/мл до 50 нг/мл.

Набор "ТВИНТЕСТ" для определения α A-ИФН на основе МКА АЗ и 5А6 выпускается в настоящее время ВНИИ ОЧБ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ К СИНТЕТИЧЕСКИМ ФРАГМЕНТАМ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ I И 2 ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ИХ ОЧИСТКИ И ХАРАКТЕРИСТИКИ

Н.Д.Перумов, А.С.Симбирцев, А.А.Колобов, А.Н.Полто-
рак, Н.М.Калинина, Н.И.Колодкин, С.А.Кетлинский,
О.А.Кауров

ВНИИ особо чистых биопрепаратов, Ленинград

Антитела к биологически активным веществам с успехом применяются для их выявления, определения концентрации в растворах и очистки. Антитела к строго детерминированным участкам аминокислотной последовательности могут быть использованы как зонды для изучения структурных особенностей молекул, в частности, для локализации активного центра.

В настоящем исследовании нами предпринята попытка использовать синтетические фрагменты аминокислотных последовательностей интерлейкинов I и 2 человека (ИЛ-I, ИЛ-2) в качестве антигенов для получения антител заданной специфичности. Выбор участков аминокислотной последовательности, потенциально способных служить антигенными детерминантами белков, основывался на следующих критериях: 1 - гидрофильность, обеспечивающая экспонирование данного участка на поверхности молекулы, 2 - вхождение в 8 поворот или неструктурированный участок полипептидной цепи, 3 - отличие от известных последовательностей сывороточных белков человека. Все расчеты проводились на ЭВМ с использованием пакета прикладных программ "Молген". Синтез пептидов проведен классическим твердофазным методом.

В работе были исследованы следующие синтетические фрагменты аминокислотных последовательностей из ИЛ-I α : I7I-I78 α , 2I2-22I α , 233-252 α ; из ИЛ-I β : 223-246 β ; из ИЛ-2: 27-35, 45-56,

15-59. Антисыворотки получали при иммунизации кроликов конъюгатами пептидов с гемоцианином либо чистыми пептидами в случае фрагментов 223-246в и 15-59 в полном адъюванте Фрейнда. Повторные иммунизации проводили в неполном адъюванте через 1, 3 и 5 месяцев.

Полученные сыворотки были испытаны методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). При этом, на платы для ИФА сорбировали сами пептиды и конъюгаты пептидов с бычьим сывороточным альбумином (БСА) либо сывороточным альбумином человека (ЧСА).

Таблица I

Изучение связывания антител к ИЛ-I с синтетическими фрагментами молекулы методом ИФА (титры антител)

Антисыворотки к синтетическим пептидам	Исследуемый синтетический фрагмент		
	212-221α-БСА	233-252α-БСА	223-246в
171-178α	0	0	0
212-221α	1:1000	0	0
233-252α	0	1:2000	0
223-246в	0	0	1:4000
Антисыворотка к нативному ИЛ-1в	0	0	1:256

Как следует из данных табл. I, сыворотки содержали антитела к пептидам из ИЛ-I, использованным для иммунизации, в титрах от 1:1000 до 1:4000. Перекрестных реакций между разными пептидами не обнаружено. Кроме того, оказалось, что антисыворотка к нативному ИЛ-1в человека обладала способностью связываться с синтетическим фрагментом 223-246 из ИЛ-1в, но не связывалась с фрагментами из ИЛ-1α, служивших в качестве контроля. По-видимому, предсказанный на основании проведенных расчетов эпитоп действительно является антигенной детерминантой ИЛ-1в. При анализе методом дот-блоттинга антитела к фрагменту 223-246в связывались с нативным ИЛ-1, частично очищенным из культуральной среды стимулированных липополисахаридом

моноцитов крови человека. Сыворотки к пептидам из ИЛ-1а не были активны в данном тесте.

Таблица 2

Изучение связывания антител к ИЛ-2 с синтетическими фрагментами молекулы методом ИФА (титры антител)

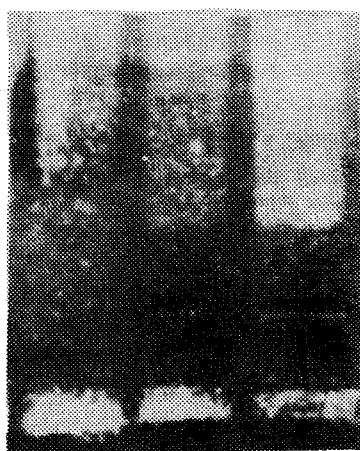
Антисыворотки	Исследуемые антигены					
	27-35 ЧСА	45-56 ЧСА	15-59	ИЛ-2 рек	233-252а БСА	223-246 в
К рекомбинантному ИЛ-2	I:256	I:512	I:8000	I:16000	0	0
К пептиду 15-59	0	0	I:4000	I:128	0	0
Преимунная сыворотка	0	0	0	0	0	0

В табл. 2 представлены результаты изучения взаимодействия различных антисывороток с синтетическими пептидами из аминокислотной последовательности ИЛ-2. Для проверки возможности того, что выбранные для синтеза участки представляют собой антигенные детерминанты молекулы ИЛ-2, была изучена их способность связываться с антителами к целой молекуле ИЛ-2, полученными при иммунизации кроликов очищенным рекомбинантным ИЛ-2 человека (ИОС, Рига).

Согласно полученным данным, антисыворотка к ИЛ-2 реагировала только с синтетическими фрагментами ИЛ-2, но не ИЛ-1, взятыми в качестве контроля. Связывание антител, образовавшихся при иммунизации биологически активной молекулой ИЛ-2, с синтетическими фрагментами свидетельствует, что выбранные нами участки соответствуют ее антигенным детерминантам.

Антисыворотка к фрагменту 15-59 реагировала с целой молекулой ИЛ-2, но не связывалась с пептидами 27-35 и 45-56, входящими в состав пептида 15-59, использованного для иммунизации в виде димера. Возможным объяснением этого факта может служить изменение конформации данного синтетического фрагмента, что подтверждается и низкими титрами антител к ИЛ-2. Тем

не менее, при анализе методом дот-блоттинга эта антисыворотка реагировала с частично очищенным препаратом ИЛ-2 из клеточной линии JURKAT (трансформированные Т-лимфоциты человека). Более того, иммуноглобулины из сыворотки к пептиду I5-59, ковалентно связанные с нитроцеллюлозным носителем, были применены для адсорбции ИЛ-2 из раствора. Для этой цели был использован препарат рекомбинантного ИЛ-2, содержащий большие количества балластного белка. При анализе связавшегося с антителами материала методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия он был представлен двумя белковыми фракциями с ММ 19 и 32 кДа (рис. 1), соответствующих электрофоретическому профилю очищенного препарата рекомбинантного ИЛ-2 человека.



а б в 2

← 44 кДа

← 30 кДа

← 14 кДа

Рис. 1. Электрофорез в градиентном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия препарата ИЛ-2, полученного иммуноаффинным методом:

а - преиммунная сыворотка; б - антисыворотка к пептиду I5-59; в - антисыворотка к рекомбинантному ИЛ-2; г - маркеры ММ.

Антисыворотки к пептидам 27-35 и 45-56, полученные при иммунизации мышей, были использованы для нейтрализации биологической активности ИЛ-2 (табл. 3). Препарат рекомбинантного ИЛ-2 человека в дозе 2 ед/мл инкубировали с различными антисыворотками в разведении 1:20 1 час при 37° С и затем еще

Таблица 3

Влияние антител к синтетическим пептидам 27-35 и 45-56
на биологическую активность ИЛ-2 человека

Антисыворотки к пептидам	Уровень пролиферации клеток (имп. в мин)	Степень подав- ления (%)
27-35	4988±329	53
I	3083±271	71
45-56 2	4795±407	53
3	6368±576	41
Нормальная мы- шинная сыворотка	9984±883	7
Антитела к иммуно- глобулинам мыши	9312±768	13
Контроль (ИЛ-2, 2 ед/мл)	10703±691	0
Контроль клеток STLL-2	605±414	-

I час с избытком кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши. Образцы центрифугировали 20 мин при 10000 g и исследовали биологическую активность ИЛ-2 в тесте стимуляции пролиферации клеток линии STLL-2 при оценке по включению ³H-тимидина.

Согласно данным табл. 3, антитела к пептидам 27-35 и 45-56 обладали способностью частично нейтрализовать биологическую активность ИЛ-2 человека, что указывает на вероятное расположение данных участков в области активного центра молекулы ИЛ-2. Полученные результаты подтверждают ранее опубликованные данные по нейтрализации биологической активности ИЛ-2 с помощью моноклональных антител, реагирующих с фрагментами 8-27 и 33-54 [2]. Кроме того, рентгеноструктурный анализ ИЛ-2 подтверждает возможность участия фрагмента 33-56 в формировании активного центра молекулы [1].

Таким образом, примененный метод поиска позволил выявить участки аминокислотной последовательности ИЛ-1 и ИЛ-2 человека, служащих антигенными детерминантами белковых молекул. Полученные к ряду синтетических фрагментов антитела обладают способностью связываться с нативными молекулами и могут быть

использованы для их всестороннего изучения и очистки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brandhuber B.J., Boone T., Kenney W.C., McKay D.B. // Science. - 1987. - V. 238. - P. 1707-1709.
2. Kuo L.-M., Robb R.J. // J. Immunol. - 1986. - V. 137. - P. 1538-1543.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, РАСПОЗНАЮЩИЕ ТИПЫ И ИЗОТИПЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА. ВОПРОСЫ СТРАТЕГИИ ПОДГОТОВ- КИ АНТИГЕНОВ И ПОЛУЧЕНИЯ ГИБРИДОМ

А.М.Пивоваров, А.В.Трофимов, Л.Ф.Арапова, С.А.Синева,
И.А.Блинова, Л.П.Коробицын

ВНИИ особо чистых биопрепаратов, Ленинград

Надежное аналитическое определение соотношения типов и изотипов иммуноглобулинов человека является важным диагностическим методом, позволяющим дифференцировать широкий спектр онкологических и некоторых иных заболеваний. Наиболее надежным, быстрым и современным является подход, использующий иммунометрические методы анализа на основе моноклональных антител. Общей схемой такого анализа будет схема, использующая высокоселективные моноклональные антитела, распознающие соответствующие цепи иммуноглобулинов в качестве первых антител, и применение общего для всех типов анализа также моноклональных антивидовых антител, например, антител к обоим типам легких цепей. Значительное многообразие типов тяжелых цепей в иммуноглобулинах человека требует проведения большой подготовительной работы по их изоляции, что представляет собой существенную проблему вследствие крайней близости свойств многих изотипов, особенно среди классов IgG и IgA. Таким образом, работы по получению гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, распознающие типы и изотипы иммуноглобулинов, требуют выбора оптимальной стратегии как на стадии подготовки антигенов, так и на стадиях иммунизации животных и скрининга гибридом. В настоящем сообщении рассматривается один из вариантов

такого рода стратегии для случая антигенов, выделяемых не из соответствующих типированных миелом, что не всегда доступно, а из сыворотки и секретов человека. Предлагаемая стратегия основана на изоляции физико-химическими методами соответствующих антигенов в относительно чистом состоянии, использовании их для первичного скрининга гибридом, полученных при иммунизации мышей цельной сывороткой человека, изоляции антител из первично отобранных клонов, иммобилизации их на нерастворимой матрице и последующем иммунохроматографическим исследованием полученных моноклональных антител с одновременной доочисткой антигенов для дальнейших работ по скринингу.

Суммарный иммуноглобулин G был выделен из цельной донорской сыворотки человека посредством стандартной ионообменной процедуры [2], и чистота его была охарактеризована методом ВЭГПХ (рис. 1) и электрофоретически. Чистота полученного продукта существенно превышала 95 %. Изоляцию IgG4 осуществляли по модифицированному методу [1] с использованием ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-Трисакриле в 0,01 М фосфатном буфере pH =

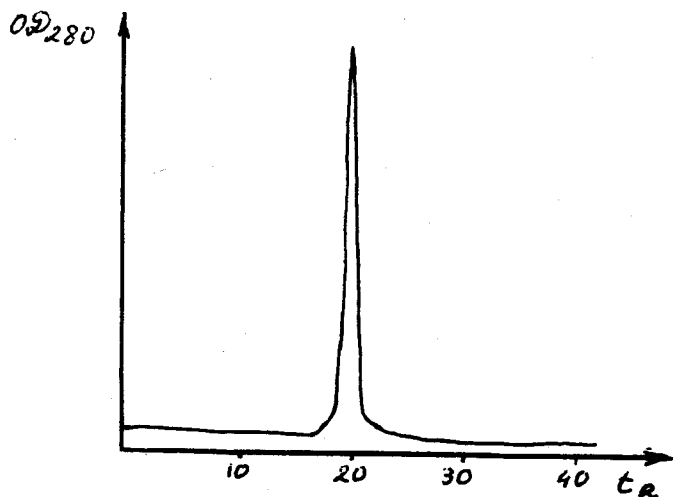


Рис. 1. Аналитическая ВЭГПХ суммарного IgG человека. Колонка 7,5x600 мм, TSK 3000SW, 0,1 М фосфатный буфер pH = 7,0, 0,35 мл/мин.

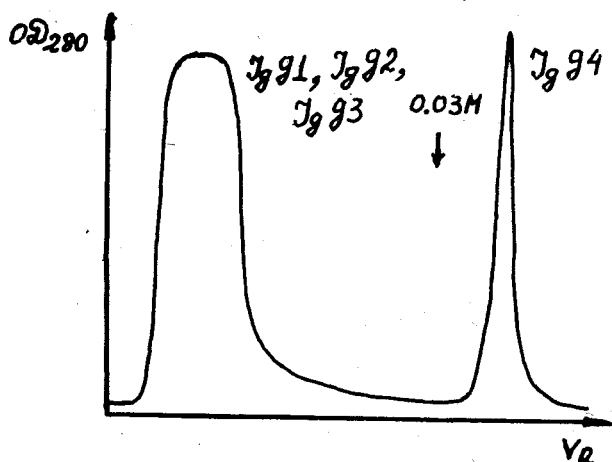


Рис. 2. Выделение IgG4 человека из суммарного препарата IgG. ДЕАЕ-Трисакрил, колонка KI5/30, 0,01 М фосфатный буфер pH = 8,0. Ступенчатая элюция 0,03 М фосфатным буфером pH = 8,0.

= 8,0, где IgG1, IgG2, IgG3 не удерживаются, а IgG4 удерживается полностью и может быть элюирован повышением ионной силы раствора, например, до 0,03 М при том же значении pH (рис.2). Суммарная фракция, содержащая только IgG1, IgG2 и IgG3 подвергались фракционированию на иммобилизованном белке *A. aureus* с учетом литературных данных по pH элюции. Выделенные фракции концентрировали ультрафильтрацией и повторно фракционировали на иммобилизованном белке А (рис. 3-6) с целью подтверждения pH элюции и дополнительной очистки. Полученные препараты характеризовали электрофорезом и изоэлектрофокусированием. Было подтверждено наличие несколько более массивной (приблизительно на 12 кД) тяжелой цепи у IgG3 и обнаружено резкое отличие интервала pI у IgG4, что полностью совпадало с литературными данными [3]. IgG1 и IgG2 анализировались с достаточной достоверностью только по величине pH диссоциации комплексов их с белком А.

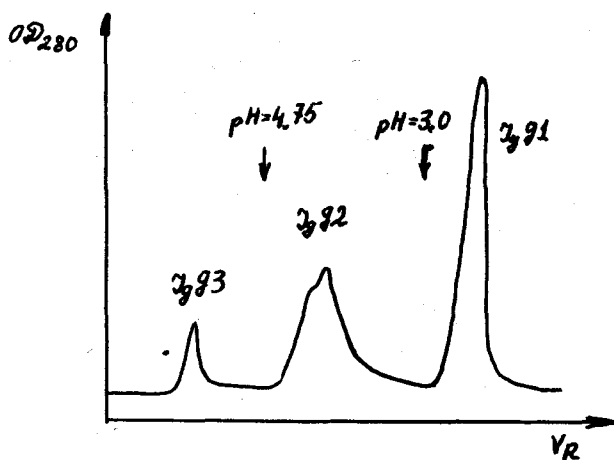


Рис. 3. Фракционирование смеси IgG1, IgG2 и IgG3 на Pr A-сефарозе. Колонка объемом 5 мл, 0,1 М глицин-HCl переменного pH.

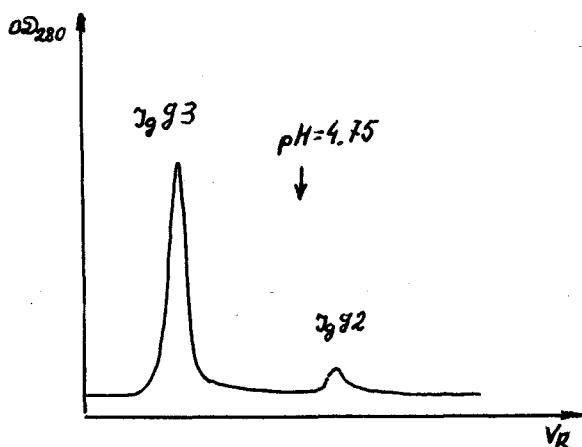


Рис. 4. Повторное фракционирование IgG3 на Pr A-Сефарозе. Условия те же, что и на рис. 3.

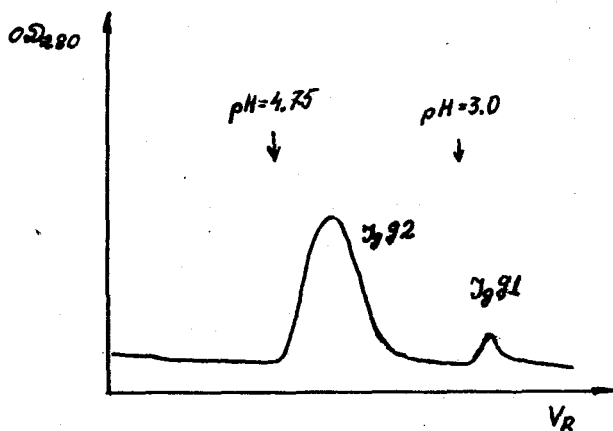


Рис. 5. Повторное фракционирование IgG2 на Pr A-Сефарозе.
Условия те же, что и на рис. 3.

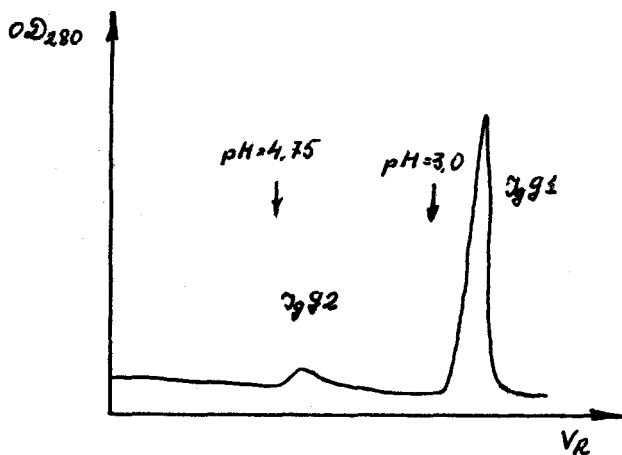


Рис. 6. Повторное фракционирование IgG1 на Pr A-Сефарозе.
Условия те же, что и на рис. 3.

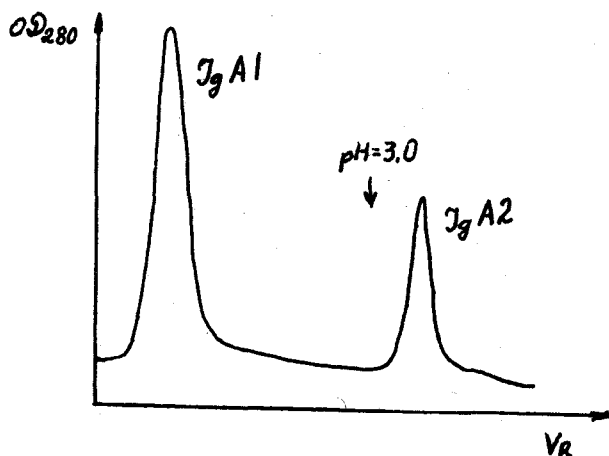


Рис. 7. Фракционирование коммерческого препарата иммуноглобулина А человека на Pr А-Сепарозе.

IgA1 и IgA2 выделяли из коммерческого препарата суммарного иммуноглобулина А (молозиво человека, Calbiochem) на иммобилизованном белке А (рис. 7). Соотношение IgA1 и IgA2 соответствовало их нормальному распределению в молозиве человека [3] (приблизительно 3:1).

Использование этих препаратов при скрининге клонов гибридом, полученных при иммунизации мышей цельной сывороткой человека, позволило выделить целый ряд клонов, перспективных для дальнейшей работы, распознающих предположительно легкие цепи иммуноглобулинов, IgA, IgG3, все изотипы IgG и все изотипы IgG за исключением IgG3. Эти клоны были переведены в асцитные варианты, моноклональные антитела были изолированы, иммобилизованы на Сепарозе и использованы далее для аналитических целей и для доочистки антигенов. Так, сравнение двух выделенных моноклональных антител с моноклональными антителами, распознающими α - и λ -цепи (любезно предоставленными В.Б.Климовичем, Ин-т рентгенологии, Ленинград) позволило идентифицировать их. Полученные иммуносорбенты с моноклональными антителами к α - и λ -цепям иммуноглобулинов человека существенно облегчили процедуру получения чистого IgM, т.е. осво-

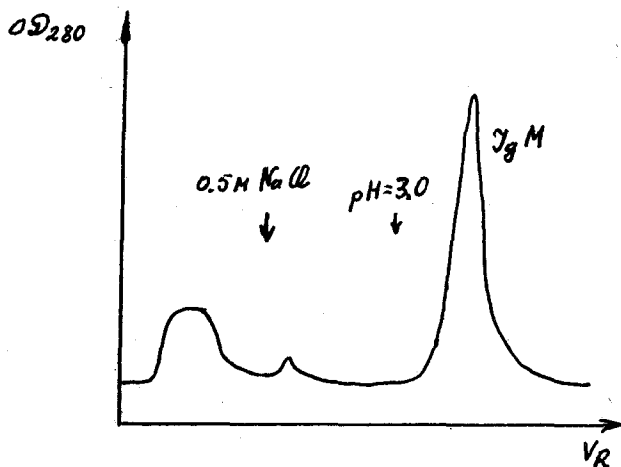


Рис. 8. Фракционирование частичноочищенного IgM человека на иммобилизованных антителах LBP2E10 и LBP1C2 (каппа- и ламбда-цепи иммуноглобулинов человека, соответственно). Колонка объемом 2 мл, концентрация лигандов на матрице - 5 мг/мл.

бождения частично очищенного по стандартной методике (ВЭГПХ) от примесей неиммуноглобулиновой природы, в первую очередь от α_2 -макроглобулина. Наличие чистого IgM (рис. 8) позволило включить и его в круг скринируемых антигенов и выделить ряд соответствующих клонов. Аналогичным образом с использованием моноклональных антител к IgG3 был получен новый препарат антигена повышенной степени чистоты для целей дальнейшего скрининга.

Ярким примером такого подхода к получению гибридом к изотипам иммуноглобулинов человека является иммунохроматографическое исследование моноклональных антител, продуцируемых клоном LBP8C2, распознающих, по данным предварительного скрининга, все иммуноглобулины класса G за исключением IgG3. Данные микропрепаративного фракционирования препаратов изотипов IgG, очищенных с использованием хроматографии на иммобилизованном белке A, представлены на рис. 9. Видно, что все препараты в

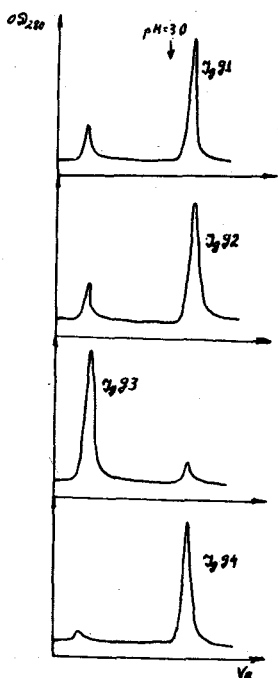


Рис. 9. Хроматографическое изучение иммобилизованных антител LBP8C2 (все IgG кроме IgG3 по предварительным данным) с использованием предварительно выделенных изотипов IgG человека. Колонка объемом 2 мл, концентрация лиганда на матрице - 4 мг/мл, образцы - по 100 мкг каждого изотипа. Сорбция в физиологических условиях, элюция - 0.1 М лимонная кислота.

той или иной степени содержат иные изотипы даже после двукратной очистки на белке А. В то же время видно и то, что эти моноклональные антитела не взаимодействуют с IgG3. Это позволило с одной стороны доочистить IgG3, а с другой - освободить препараты остальных изотипов IgG от примесей IgG3 и, тем самым, повысить надежность дальнейшего скрининга.

Обнадёживающие результаты, полученные при использовании рассмотренной стратегии подготовки антигенов, выделяемых из сывороток и секретов человека, позволяют надеяться на успех работ по получению гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к остальным изотипам иммуноглобулинов человека и некоторым цепям, таким, как J и S.

Авторы выражают глубокую благодарность В.Б.Климовичу за любезно предоставленные ими препараты моноклональных антител к κ - и λ -цепям иммуноглобулинов человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bird P., Lowe J., Stokes R.P. et al. // J. Immunol. Meth. - 1984. - V. 7. - P. 97-105.
2. Immunological Methods / Ed. by Lefkovits I. / Academic Press Inc., N.-Y., London, 1985. - P. 109-111.
3. Lindmark R., Thoren-Tolling K., Sjöquist J. // J. Immunol. Meth. - 1983. - V. 62. - P. 1-13.

ОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО БЕЛКА МУКОВИСЦИДОЗА ПРИ ПОМОЩИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

М.Л.Тедер

НИИ общей и молекулярной патологии Тартуского
госуниверситета

Муковисцидоз (МВ) является одним из наиболее распространенных генетических заболеваний у белого населения. Дефектный ген, вызывающий МВ, находится в 7 хромосоме, но соответствующий белок еще не установлен. Одним из диагностически значимых биохимических маркеров этой болезни, манифестирующих количественное соответствие дозе гена как у пациентов-гомозигот, так и у бессимптомных гетерозигот, является т.н. белок муковисцидоза (БМВ). БМВ был обнаружен в 1973 г. Вильсоном в сыворотке крови в комплексе с IgG [7].

В данной работе разработан метод изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) в ультратонком геле агарозы для аналитического и препаративного выявления БМВ. Приведены результаты выработки моноклональных антител (МКА) и БМВ.

Материал и методика

Изоэлектрическое фокусирование. В геле содержалось 0,8 % агарозы, 10 % сорбитола, 4 М мочевины и следующие амфолиты: I, 44 % pH 5-8, 0,48 % pH 8-9,5, 0,24 % pH 7-9, 0,12 % pH 9-11. В качестве анолита использовали 0,3 М HEPES и в качестве католита 2 М этилендиамин с 0,025 М аргинином и 0,025 М лизином. БМВ был выявлен из плазмы крови или из очищенной фракции IgG. Очистку IgG проводили при помощи аффинной хроматографии на

колонке Ultrogel-Protein A. После ИЭФ белки фиксировали в 10 % сульфосалициловой кислоте и окрашивали последовательно Кумасси ярко-голубым (Serva W) [5] и серебром [6]. Присутствие БМВ в пробе оценивали по двухбальной шкале [4].

Выработка и скрининг МКА. В качестве антигена использовали: 1) комплекс IgG-БМВ, полученный из плазмы пациентов МВ при помощи аффинной хроматографии на колонке Ultrogel-Protein A и препаративного ИЭФ в геле агарозы. Соответствующую БМВ полосу геля вырезали и гомогенизировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ); 2) лизат гранулоцитов от пациентов хроническим миеломным лейкозом. Гранулоциты выделяли с помощью градиента плотности Верографин/Фиколл 400 [5], клетки лизировали замораживанием-размораживанием и ультразвуком. Полученную суспензию центрифугировали и пользовались супернатантом.

Иммунизацию мышей линии BALB/c провели по двухнедельной схеме [1]. Клетки селезенки от иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы линии РА1 при помощи 50 % ПЭГ 4000 (Merck) по методу Harwell et al. [2]. Супернатанты от полученных гибридных клонов тестировали иммуноферментным методом, в котором антигеном был использован комплекс IgG-БМВ или лизат гранулоцитов, поскольку получение чистого БМВ затруднено ввиду его малого содержания и малой ММ. Для устранения перекрестных реакций между антигенами и мечеными пероксидазой козыми антителами к мышиным Ig конъюгат предварительно адсорбировали с IgG человека или работали с мечеными козыми F(ab)₂ фрагментами IgG. Схемы использованных методов скрининга приведены на рис. 1.

Результаты

Результаты ИЭФ образцов от пациентов МВ, их родителей и контрольных индивидов представлены на рис. 2. БМВ выявляется на последнем катодном сантиметре окрашенного рисунка белковых полос (pI 8,5-8,6). В табл. I приведены результаты идентификации БМВ в трех генетических группах. Полученные средние оценки для гомозигот и гетерозигот между собой существенно не различаются, но существенно отличаются от соответствующей оценки контроля ($P < 0,001$; Student t-тест). Выработанный метод ИЭФ используется в качестве дополнительного теста в диагнос-

1. Антиген (АГ) адсорбирован прямо на твердофазном носителе

2. Антиген (АГ) адсорбирован через поликлональное антитело морской свинки к IgG-БМВ

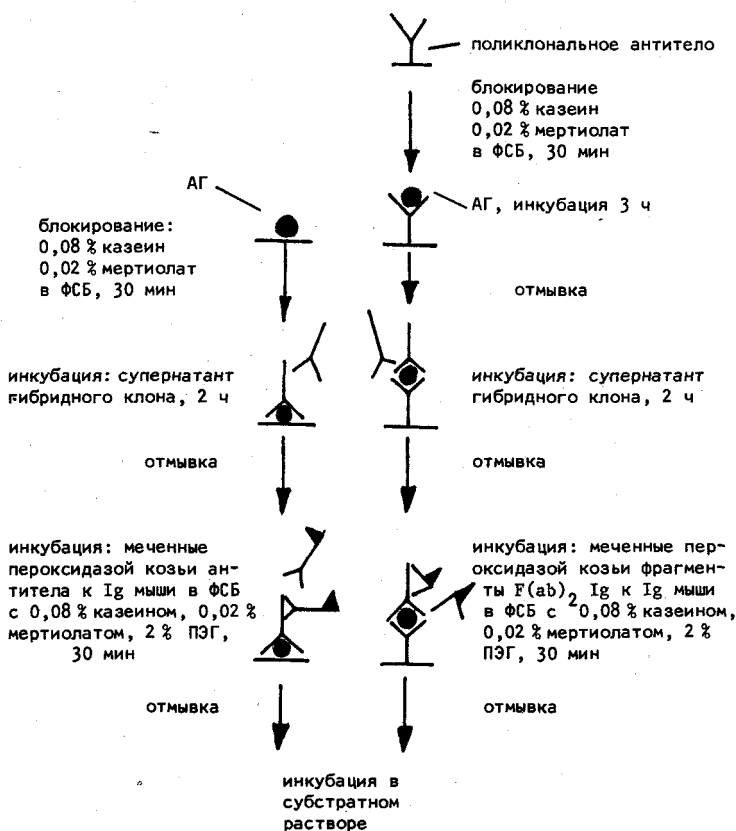


Рис. I. Схема использованных методов скрининга.

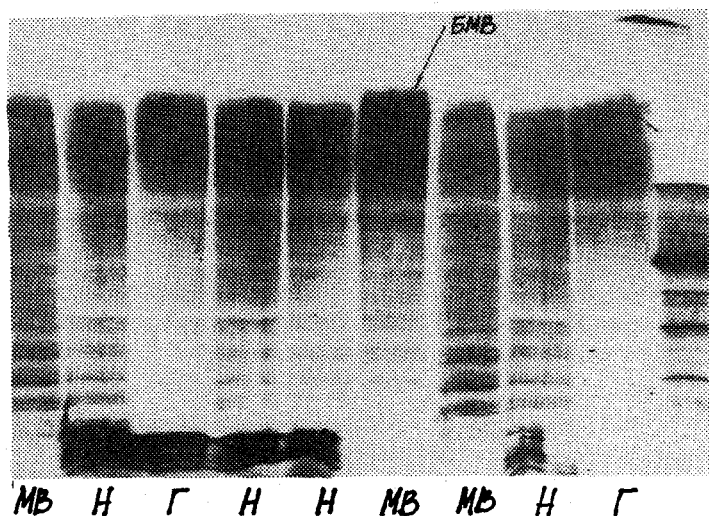


Рис. 2. Выявление БМВ изоэлектрическим фокусированием в ультратонком геле агарозы в градиенте pH 5-II.

МВ - пациент муковисцидозом (гомозигота); Г - родитель пациента (гетерозигота); Н - нормальный индивид.

Таблица I

Результаты выявления БМВ по методу ИЭФ
в агарозном геле

Группа обследованных	Число индивидов	Средняя арифметическая оценка	Число положительных индивидов	% положительных индивидов
Контроль	15	$0,20 \pm 0,39$	I	6,67
Обязательные гетерозиготы	33	$1,68 \pm 0,37$	30	90,91
МВ пациенты	25	$1,75 \pm 0,38$	24	96,00

тике MB, а также как один из этапов в препаративной очистке БМВ.

В результате использованных нами методов иммунизации и гибридизации было получено 703 клон. Из них было выбрано 77, реагирующих позитивно по меньшей мере по одному из использованных нами методов скрининга. Сравнительный скрининг показывает, что реакция МКА с антигеном зависит от метода экспонирования антигена (табл. 2). Некоторые МКА реагируют с соответствующим антигеном только в том случае, если антиген иммобилизован через поликлональные антитела. Вероятно, такие МКА узнают антигенные детерминанты, экспонированные только в нативном белке. В то же время те антигенные детерминанты, которые в нативном белке неузнаваемы, могут быть экспонированы антителам при прямом адсорбировании на нитроцеллюлозный фильтр в Dot-скрининге. Для более подробного исследования полученных МКА вырабатываются методы blotting-скрининга.

Таблица 2

Реакции МКА в зависимости от метода скрининга

МКА	Антигены и способы их связывания		
	прямое	через поликлональное антитело	
	ЛГ	ЛГ	IgG-БМВ
3В4	+	+	+
4D2	-	+	+
3D2	+	-	-
2В3	+	+	-
2D10	-	+	-
4A6	-	+	+
1D3	+	-	+
3A3	-	+	-
3A11	+	+	+
2A9	-	-	+

ЛГ - лизат гранулоцитов

IgG-БМВ - комплекс белка муковисцидоза с IgG

ЛИТЕРАТУРА

1. Cianfriglia M., Mariani M., Armellini D. et al. // *Methods Enzymol.* - 1986. - V. 121. - P. 193-210.
2. Harwell L.W., Bologino M., Bidlack J.M. et al. // *J. Immunol. Methods.* - 1984. - 1984. - V. 66. - P. 59-67.
3. Madyastha P., Madyastha K.R., Wade T., Levine D. // *J. Immunol. Methods.* - 1982. - V. 48. - P. 281-286.
4. Super M., Swindlehurst C. // *Am. J. Med. Genet.* - 1984. - V. 18. - P. 449-453.
5. van Triet A.J. // *Electrophoresis.* - 1984. - V. 5. - P. 374-376.
6. Willoughby E.W., Lambert A. // *Anal. Biochem.* - 1983. - V. 130. - P. 353-358.
7. Wilson G.B., Jahn T.L., Fonesca J.R. // *J. Clin. Chim. Acta.* - 1973. - V. 49. - P. 79-91.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ПРОСТАГЛАНДИНАМ СЕРИИ Е

Л.А.Селезнева, Е.А.Перфильева, С.Н.Курочкин

НИИ Биомедицинской технологии МЗ СССР, Москва

Простагландины серии Е играют важную роль в регуляции различных процессов жизнедеятельности организма [4-6]. Для количественного определения их в биологических жидкостях все более широкое применение находят чувствительные радиоиммунные и иммуоферментные методы, в которых используются антипростагландиновые антитела. Возможность выработки специфических антисывороток к ряду простагландинов путем иммунизации животных конъюгатом простагландин-белок продемонстрирована давно, однако, получение моноспецифических поликлональных антител к простагландинам серии Е затруднено. В результате их химической и метаболической нестабильности формируется иммунный ответ также на простагландины F и B [2]. Решение этой проблемы может заключаться в использовании гибридной технологии, которая дает возможность отобрать клеточные продуценты, секретирующие антитела, специфичные только к простагландинам серии Е.

Мышей самок BALB/c иммунизировали конъюгатом простагландина E_2 с бычьим сывороточным альбумином без спейсера или содержащим спейсерную группировку. В качестве спейсера была использована ϵ -аминокапроновая кислота. Ковалентное связывание простагландина E_2 и ϵ -аминокапроновой кислоты с белком осуществляли методом смешанных ангидридов [3]. Конъюгаты содержали 14-20 молей гаптена на 1 моль белка.

Мышей иммунизировали 50 мкг конъюгата в смеси с полным адъювантом Фрейнда еженедельно в течение 2-3 месяцев. В крови, взятой из хвостовой вены, радиоиммунным методом [1] определяли титры антител по связыванию меченных тритием простагландинов E_1 , E_2 , $F_{2\alpha}$ и B_2 . Животным с высокими титрами антител к простагландинам E_1 и E_2 внутривенно вводили по 10 мкг иммуногена за 4 дня до гибридизации.

Гибридизацию спленоцитов проводили с клетками мышиной миеломы Sp2/0 с помощью полиэтиленгликоля 4000. Через 10-14 дней культуральную жидкость анализировали на наличие антипростагландиновых антител радиоиммунным и иммуноферментным методами. Клонирование "положительных" гибридных культур проводили в мягком агаре. На 7 день проводили отбор клонов и подращивали их на фидерных макрофагах. Активные продуценты подращивали на 12- и 24-луночных платах и по достижении биомассы свыше 10^6 клеток вводили внутрибрюшинно мышам линии BALB/c, обработанным пристаном для образования асцитной опухоли.

Асцитическую жидкость освобождали от гибридомных клеток, а супернатант использовали для выделения моноклональных иммуноглобулинов. Его прогревали при 56°C и проводили осаждение глобулиновой фракции 40 % насыщением сульфатом аммония, соли удаляли диализом, а иммуноглобулины лиофильно высушивали.

При использовании для гибридизации спленоцитов мышей, иммунизированных конъюгатом без спейсера, выделены 2 положительных клона. Они оказались стабильными в отношении продукции моноклональных антител к простагландину E_2 с константой аффинности $0,46 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ и $0,89 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. С помощью иммуноферментного анализа было показано, что простагландины A_2 , B_2 , D_2 и 6-кето- $F_{1\alpha}$ не связывались с антителами до концентрации 10 мкг/мл, тогда как простагландины $F_{2\alpha}$ и E_1 давали высокий перекрест с простагландином E_2 , равный 50 % и 100 %, соответствен-

но. Кроме того, из 24 клонов 19 выделяли антитела, связывавшие простагландин E_2 .

Использование конъюгата со спейсером позволило значительно улучшить специфичность антител. Они не давали перекрестной реакции с простагландинами $E_{2\alpha}$ и E_2 . Из 26 положительных клонов гибридом I продуцировал антитела, реагирующие только с простагландином E_1 , I - только с простагландином E_2 , I6 - антитела одинаковой специфичности к простагландинам E_1 и E_2 , а остальные гибридомы давали антитела с неравным сродством к обоим простагландинам.

На основе антител из первой серии экспериментов с $K_{aff} = 0,89 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ и конъюгата простагландина E_2 с пероксидазой разработан твердофазный конкурентный иммуноферментный тест для количественного определения простагландинов серии E в диапазоне от 50 до 1000 пкг в пробе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dray F., Charbonnel B., Macclouf J. // Eur. J. Clin. Invest. - 1975. - V. 5. - P. 319-325.
2. Dray F., Mamas S., Bizzini B. // Meth. Enzymol. - 1982. - V. 86. - P. 258-269.
3. Jaffe B.M., Smith J.W., Newton W.T., Parker C.W. // Science. - 1971. - V. 171. - P. 494-496.
4. Kirtland S.J. // Prostagl. Leuk. Essent. Fatty Acids. - 1988. - Reviews 32. - P. 165-174.
5. Kuehl F.A., Egan R.W. // Science. - 1980. - V. 210. - P. 978-984.
6. Lewis J. // Br. Med. Bull. - 1983. - V. 39. - P. 243-248.

ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО УРОВНЯ ИММУНОГЛОБУЛИНА Е У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

О.А.Сердюк, Р.Г.Василов

ВНИИ "Биотехнология" Минмедбиопроста СССР, г. Москва

Определение концентрации общего иммуноглобулина Е (IgE) в сыворотке или плазме крови детей и подростков может быть информативно при выявлении групп риска детей, предрасположенных к аллергическим заболеваниям [3]. Известно, что концентрация IgE у детей низка по сравнению со взрослым уровнем, составляя в норме у новорожденных 1-2 Международных единиц в мл (Ме/мл)* [2]. С возрастом концентрация IgE увеличивается, достигая примерно к 15-ти годам взрослого уровня [6]. Чтобы детектировать такие незначительные концентрации IgE, необходим надежный высокочувствительный метод определения уровня IgE. Использование моноклональных антител (МКА) с высокими константами связывания, специфичных к различным эпитопам молекулы антигена (в данном случае молекулы IgE), позволяет разработать такой метод.

Была поставлена задача разработать тест-систему для достаточно быстрого, простого и надежного измерения концентрации IgE в диапазоне 1-100 Ме/мл в неразведенной сыворотке крови с минимальным объемом образца сыворотки и одностадийным проведением иммунохимической реакции.

Методика исследования

В работе использовали МКА к IgE человека, описанные ранее [1]. Очистку МКА из асцитной жидкости проводили с помощью ионообменной хроматографии на ДЕАЕ целлюлозе [4]. МКА IgE/11-4 иммобилизовали на твердой фазе - полистироловых планшетах "Nunc-Immunol" из карбонатного буфера 0,05 М, pH 9,6 с концентрацией МКА 5-10 мкг/мл, в течение 16 часов при +4° С. Затем участки неспецифического связывания блокировали 0,2 % желатиной в забуференном фосфатами физиологическом растворе, pH 7,4, содержащем 0,1 % азид натрия. Приготовленные таким

*1 Ме = 2,4 нг IgE

образом запечатанные планшеты хранились при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение нескольких месяцев. МКА IgE/11-1 конъюгировали с пероксидазой хрена по методу периодатного окисления [7,5] с некоторыми модификациями: стадию диализа после окисления пероксидазы заменили гель-фильтрацией на Сефадексе G-25 (с учетом разбавления на колонке начальные растворы пероксидазы и периодата натрия брали в 2,5 раза более концентрированными). Это значительно сократило время приготовления конъюгата и снизило вероятность образования высокомолекулярных полимеров. Диализ после восстановления боргидридом натрия также был заменен на гель-фильтрацию на Сефадексе G-25. Приготовленный таким образом конъюгат МКА с пероксидазой хрена не нуждался в хроматографической очистке, так как практически не содержал высокомолекулярных полимеров и свободной пероксидазы, что было показано гель-фильтрацией на Сефакриле С-300. В полученный раствор конъюгата добавляли равный объем глицерина и хранили при -20°C в течение нескольких месяцев. Рабочее разведение конъюгата подбирали такое, чтобы максимальный стандарт 100 МЕ/мл в заданных условиях реакции давал оптическую плотность 1,6-1,9 единиц. Стандарты IgE были приготовлены путем разведений миеломного белка IgE (Ю) в лошадиной сыворотке, осветленной центрифугированием (100000 г, 1 час). Стандарты откалибровывали по 2-му Международному стандарту ВОЗ № 75/502 для сывороточного IgE человека. В качестве нулевого контроля использовали сыворотку лошади.

Определение IgE иммуноферментным методом проводили, как описано в литературе. Объем образца сыворотки составлял 15 мкл, образцы и конъюгат МКА с пероксидазой инкубировали в планшете одновременно, 1 час при 37°C . Ферментативная реакция шла 10 мин при комнатной температуре, концентрация о-фенилендиамина составляла 0,6 мг/мл, перекиси водорода - 0,02 %. Параллельное определение концентрации IgE иммуноферментным набором фирмы "Behring" (ФРГ) проводили по инструкции к этому набору. Корреляцию результатов вычисляли по программе "Статграф" на ИБМ-ПК.

Результаты исследования

В результате проведенной работы получена твердофазная иммуноферментная система, позволяющая определять концентрации общего IgE в сыворотке и плазме крови детей по принципу "сэндвич" с использованием двух МКА различной специфичности. Основные аналитические характеристики тест-системы и результаты проведенных испытаний представлены в табл. I.

Таблица I

Основные характеристики иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител для количественного определения общего уровня иммуноглобулина Е в сыворотке или плазме крови детей и подростков

Основные характеристики

Принцип метода анализа	одностадийный, твердофазный, иммуноферментный (иммунометрический) на основе комбинации двух моноклональных антител различной специфичности
Общее время анализа	1,5 часа
Чувствительность	1 Ме/мл
Диапазон измерений	1-100 Ме/мл
Тип калибровочной кривой	линейный или близкий к линейному
Воспроизводимость (коэффициент вариабельности)	$\pm 5 \%$
Аддитивность (тест на "открытие")	100 $\pm 5 \%$
Объем пробы (при проведении анализа в дубликатах)	15 мкл x 2

Установлено, что в данной тест-системе отсутствует эффект высоких концентраций (хук-эффект). Для этого измеряли образцы, содержащие высокие, до 160 мкг/мл (или 67000 Ме/мл) концентрации IgE(Н). Все полученные значения превышают максимум шкалы оптической плотности; следовательно, отсутствует возможность получения ложно-заниженных значений концентрации IgE, т.е. хук-эффект не проявляется.

Был проведен также тест на линейность разведений. Несколько образцов сывороток с высоким содержанием IgE развели нулевым контролем в 2, 4, 8 и 16 раз. Зависимость полученных значений концентраций IgE от разведения для проанализированных образцов сывороток была близка к линейной (рис. 1). Таким образом, сыворотки с содержанием IgE более 100 Ме/мл можно измерять разведенными в несколько раз без существенной ошибки.

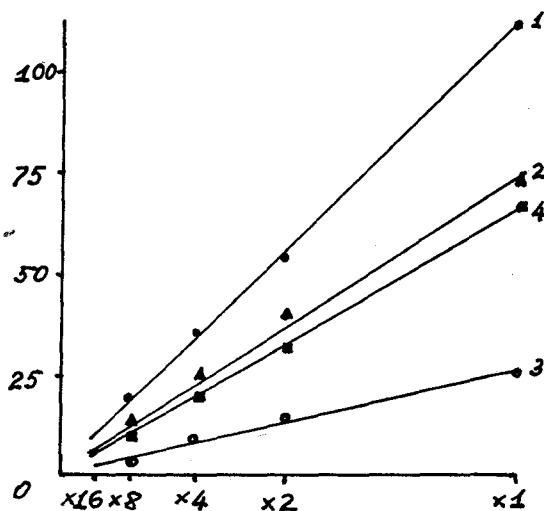


Рис. 1. Линейность зависимости концентрации IgE от разведений образцов сыворотки крови. По оси абсцисс: разведения сыворотки. По оси ординат: концентрация IgE, Ме/мл. 1-4 - номера образцов.

Исследовано влияние антикоагулянтов и компонентов сывороток на измерения. К сыворотке с известной концентрацией IgE добавляли антикоагулянты, гемоглобин, билирубин, липиды, теофиллин. Как было установлено, существенного влияния на результаты эти вещества не оказывают, что позволяет проводить измерения IgE в плазме крови пациента, в липемических, гемолитических и икретических сыворотках, а также в сыворотке больных, получающих терапевтические дозы теофиллина.

В завершение было проведено параллельное измерение концентрации IgE в сериях образцов сывороток детей с помощью данной тест-системы и иммуноферментного набора фирмы "Behring". Коэффициент корреляции составил 0,90 (рис. 2).

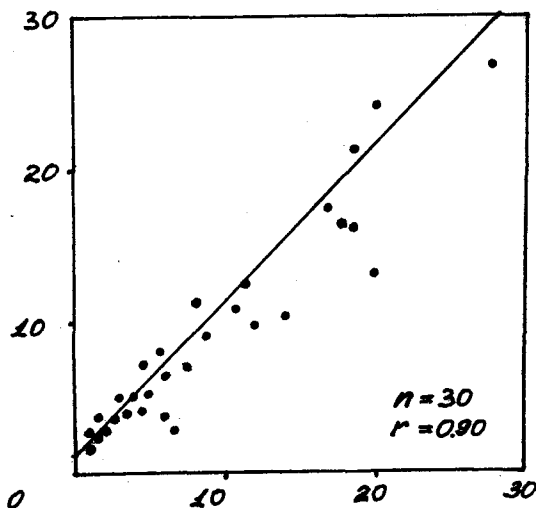


Рис. 2. Сравнение разработанной тест-системы для определения концентрации IgE с иммуноферментным набором фирмы "Behring". По оси абсцисс: концентрация IgE, измеренная иммуноферментным набором фирмы "Behring". По оси ординат: концентрация IgE, измеренная с помощью разработанной тест-системы. Единица измерения - I Ме/мл.

Таким образом, разработанная тест-система позволяет эффективно измерять концентрации IgE в сыворотке и плазме крови детей и подростков. Тест-систему отличают высокая чувствительность, воспроизводимость, аналитическая надежность, а кроме того, быстрота проведения анализа и простота исполнения. Результаты, полученные с помощью разработанной тест-системы, достаточно хорошо коррелируют с результатами, полученными с использованием коммерческого иммуноферментного набора фирмы "Behring". Тест-система может применяться в клинике для серийных измерений концентрации IgE в области детской аллергологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев Р.Г. и др. // Биотехнология. - 1988. - № 3.
2. Иегер Л. / Клиническая иммунология и аллергология // М.: Медицина, 1983. - Т. 2.
3. Ошват П. Аллергические и иммунологические болезни детского возраста // Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1983.
4. Bourgois A., Fougereau M. // Eur. J. Biochem. - 1970. - V. 12. - No. 3. - P. 558-564.
5. Tijesen F. // Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. - 1985. - V. 15. - P. 29-31.
6. Bazaral M., Hamburger R.N. // J. Allergy Clin. Immunol. - 1972. - V. 49. - No. 3. - P. 189-191.
7. Shimizu S.J., Kabakoff D.S., Sevier E.D. // Enzyme-mediated immunoassay / Ngo T.T., Lenhoff H.M. eds. New York, Plenum Press, 1985. - P. 433-450.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ТИРЕОИДНЫМ ГОРМОНАМ ТЗ И Т4

Р.В.Сикут, А.-В.Н.Микельсаар

НИИ общей и молекулярной патологии Тартуского государственного университета

Целью настоящей работы является получение при помощи гибридной технологии стабильных клеточных линий, продуцирующих моноклональные антитела (МКА) к тиреоидным гормонам ТЗ и Т4,

и разработка на основе МКА-подходящего для клинического применения нерадиологического иммунометода определения этих гормонов в биологических жидкостях. Работа выполняется в рамках программы КП НТП СЭВ (задание 5.2.3.2.2.). В данной части работы излагаются результаты по получению гибридом и характеристике полученных антител.

Иммунизация. Мышей линии ВАЛВ/с иммунизировали конъюгатами гормонов с бычьим сывороточным альбумином (БСА). ТЗ-БСА и Т4-БСА конъюгаты были приготовлены карбодиимидным методом [2]. Иммунизацию провели по схеме, описанной Cianfriglia и сравт. [1] (табл. I).

Таблица I

Схема иммунизации

Дни до слияния	Количество антигена (мкг)
- 15	50 и.п. + ПАФ
- 8	50 и.п. + ПАФ
- 3	400 и.п.
- 2	200 и.п. + 200 и.в.
- 1	200 и.п. + 200 и.в.
ПАФ - полный адъювант Фрейнда	и.п. - интраперитонеально и.в. - интравенозно

Слияние провели с миеломными клетками Sp2/0 по слегка модифицированному методу Harwell и др. [3].

Определение положительных клонов. Супернатанты от гибридомных клонов тестировали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) параллельно на чистом БСА и ТЗ-БСА (или Т4-БСА) конъюгате. Для дальнейшей работы были отобраны клоны, антитела которых реагировали с конъюгатом гормона с БСА, но не с чистым БСА.

Определение перекрестных реакций провели методом конкурентного ИФА: 100 мкл ТЗ-БСА (Т4-БСА) конъюгата (25 мкл/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7,2) адсорбировали на микротитрационной пластинке (Nunc) 4 часа при 37° С или 16-20 часов при 4° С, затем лунки пластинок блокировали раствором ка-

зеина (0,06 % в ФСБ) 30 мин при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора в лунки вносили 90 мкл супернатанта гибридного клона (растворенного 1:6 в ФСБ) и 10 мкл раствора исследуемых конкурентных к Т3 и Т4 веществ (табл. 2).

Таблица 2

Перекрестные реакции моноклональных антител 2G6 и 2B2

Конкурентное вещество	Перекрестная реакция (%)	
	2G6 (IgG1)	2B2 (IgG)
3, 3', 5-трийодо-L-тиронин (Т3)	100	0,01
3,3', 5-трийодо-D-тиронин	63	н.о.
тироксин (Т4)	0	100
3,3', 5'-трийодо-L-тиронин (reverse-T3)	0	3,32
3,5-дийодо-L-тирозин	0	0,01
3-йодотирозин	0	2,59
тирамин	0,02	0
3-окситирамин	0,01	0,02
адреналин (эпинефрин)	0	н.о.
норадреналин (артеренол)	0	н.о.
фенилаланин	0	н.о.
тирозин	0	н.о.
3,4-диоксифенилаланин	0	н.о.
гомогентизиновая кислота	0	н.о.

н.о. - не определено

Пластинки выдерживали 2 часа при комнатной температуре, промывали трижды ФСБ и в лунки вносили 100 мкл раствора козьих антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных пероксидазой. После двухчасовой инкубации при комнатной температуре пластинки промывали трижды ФСБ и в лунки вносили 100 мкл субстратной смеси (0,5 мг/мл о-фенилендиамина и 0,03 % H_2O_2 в 0,1 М цитратфосфатном буфере, pH 5,0). Интенсивность реакции оценивали при 490 нм на автоматическом спектрофотометре Micro-ELISA Auto Reader MR580 (Dynatech Instruments, USA). Степень перекрестных реакций оценивали по компьютерной про-

грамме 'Cross-ELISA', разработанной М.Вийкмаа [4], и выражали в процентном отношении концентрации ТЗ (или Т4), вызывающей 50 %-ое снижение интенсивности реакции, к концентрации конкурентного вещества, вызывающей такой же эффект.

В одном опыте гибридизации получены 4 клона, антитела которых реагируют специфически с гормоном ТЗ (реагируют с ТЗ-БСА, но не с Т4-БСА или БСА). Антитела одного из этих клонов (2G6), отличающиеся от других более высокой аффинностью, были подвергнуты детальному анализу перекрестных реакций с рядом возможных конкурентных веществ к ТЗ и Т4. В другом опыте гибридизации получен клон 2B2, который реагирует с Т4, но практически не реагирует с ТЗ (табл. 2). Антитела этого клона тоже подвергнуты анализу перекрестных реакций.

Оба МКА (2G6, 2B2) потенциально подходят для определения соответствующих гормонов в биологических жидкостях. В настоящее время планируется использование этих антител в иммуно-тестах для количественного определения гормонов ТЗ и Т4 в сыворотке крови человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cianfriglia M., Mariani M., Armellini D. et al. // *Meth. Enzymol.* - 1986. - V. 121. - P. 193-210.
2. Ferrua B., Genetet F., Savaron M.L. et al. // *J. Immun. Meth.* - 1986. - V. 87. - P. 137-143.
3. Harwell L.W., Bolognino M., Bidlack J.M. et al. // *J. Immun. Meth.* - 1984. - V. 66. - P. 59-67.
4. Вийкмаа М.Г., Микельсаар А.-В.Н., Юронен Э.И. // Генная и клеточная инженерия в решении фундаментальных проблем биотехнологии. - Тарту: Тартуский госуниверситет, 1989. - Т. 2. - С. 23-32.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФРАГМЕНТОВ МОЛЕКУЛЫ IgE ЧЕЛОВЕКА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧ- НОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Е.Я.Смирнова, Р.Г.Василов

ВНИИ "Биотехнология" Минмедбиопрома СССР, г. Москва

Иммуноглобулин Е (IgE) играет важную роль в развитии ряда патологических процессов, в частности, в развитии аллергических реакций.

Уровень общего и аллергенспецифического IgE в крови является важным диагностическим показателем. В норме концентрация IgE у человека составляет 100-200 нг/мл. При патологических процессах уровень IgE резко возрастает и достигает 2-5 мкг/мл и выше.

Роль IgE в развитии патологических процессов была понята относительно недавно, а сама молекула была впервые описана в 1966 году. Схема строения молекулы IgE представлена рис. 1.

С целью создания диагностикумов для определения концентрации общего и аллергенспецифического IgE человека в нашей лаборатории была получена серия моноклональных антител к IgE человека [1]. Суммарные свойства этих антител кратко приведены в таблице 1. Две пары антител из этой панели были отобраны для создания клинических иммунодиагностикумов [1,2].

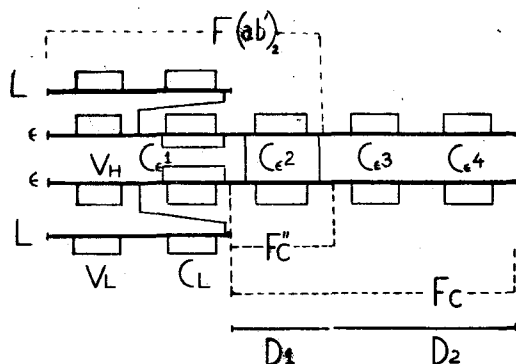


Рис. 1. Схема строения молекулы иммуноглобулина Е. L - легкие цепи, H(ε) - тяжелые цепи. На рисунке указаны места расщепления молекулы папаином и пепсином (+) и расположение антигенных детерминант.

Таблица I
Характеристика моноклональных антител серии IgE/11

			Константа связывания M^{-1}	\bar{X}	Связывание с IgE (N)	Связывание с поликло- нальным IgE	Способ выделения асцит/культураль- ная жидкость (C/N)
1.	IgE/11-1	$\gamma 1, k$	$2,8 \times 10^9$	1,74	+	+	асц - иох
2.	IgE/11-2	$\gamma 1, k$	$2,7 \times 10^9$	0,37	+	+	асц - иох
3.	IgE/11-3	$\gamma 1, k$	$1,3 \times 10^9$	1,87	+	+	асц - иох
4.	IgE/11-4	$\gamma 1, k$	$1,1 \times 10^{10}$	0,15	+	+	асц - иох
5.	IgE/11-5	$\gamma 1, k$	$0,9 \times 10^9$	2,87	+	+	асц - иох
6.	IgE/11-6	$\gamma 2a, k$	-	-	+	+	C/N - Pга - сеф
7.	IgE/11-7	$\gamma 1, k$	-	-	+	+	C/N - Pга - сеф
8.	IgE/11-8	$\gamma 2a, k$	-	-	+	+	асц - Pга - сеф
9.	IgE/11-9	$\gamma 1, k$	-	-	+	-	асц - Pга - сеф
10.	IgE/11-10	$\gamma 1, k$	-	-	+	-	асц - иох

В настоящей работе ставилась задача дальнейшей характеристики тонкой антигенной специфичности полученных МКА с использованием IgE, выделенного из различных источников, а также протеолитических фрагментов IgE.

Работа состояла из следующих основных этапов: создание сорбентов на основе МКА для препаративного выделения IgE из биологических жидкостей, биохимическая характеристика выделенных препаратов и их сравнение с миеломным IgE (Ю)*, выделенным хроматографически из плазмы миеломного больного [6], изучение тонкой антигенной специфичности полученных моноклональных антител с использованием IgE, выделенного разными способами, а также протеолитических фрагментов IgE.

Результаты исследований. Сорбенты были приготовлены на основе BrCN-активированной сефарозы 4В и Affi Gel 10 (Bio-Rad) с 5 из 10 МКА, а также с кроличьими антителами к IgE (ДАКО). Подобраны условия посадки антител и элюции IgE. Наилучшие результаты дали сорбенты с антителами IgE/11-4 и IgE/11-5.

На этих сорбентах, а также на сорбенте с кроличьими антителами был выделен IgE из супернатанта клеточной линии IWE, секретирующей IgE в концентрации 2-4 мкг/мл, которая детально описана в работе [5]. На сорбенте с кроличьими антителами был также выделен поликлональный IgE из сыворотки больного после плазмофореза (выход составил 25-30 % от исходного количества). Количество IgE оценивали иммуноферментным методом [2]. Полученные препараты были оценены электрофоретически. По молекулярному весу вновь выделенные препараты IgE были идентичны миеломному IgE (Ю), выделенному хроматографически. IgE, выделенный на сорбенте с кроличьими антителами, при окраске гелей Кумасси R-250 был гомогенен. Препараты, полученные на сорбентах с МКА, нуждались в дальнейшей очистке.

Для дальнейшего изучения выделенный нами IgE IWE и миеломный IgE (Ю) были подвергнуты протеолитическому расщеплению папаином (Sigma) и трипсином (Sigma). Фрагменты, полученные в результате обработки IgE ферментами, оценивали электрофоретически по Laemmli [4]. В сообщении рассматриваются данные, полученные в результате обработки IgE папаином.

*Миеломный IgE (Ю) был любезно предоставлен д.м.н. Д.В.Стефани.

Изучение кинетики накопления протеолитических фрагментов позволило выбрать оптимальное время протеолиза - 24 часа, в течение которого происходит полное переваривание нативной молекулы и одновременно наблюдается максимальное накопление высокомолекулярных фрагментов молекулы IgE (рис. 2 а-г), что соответствует литературным данным [3].

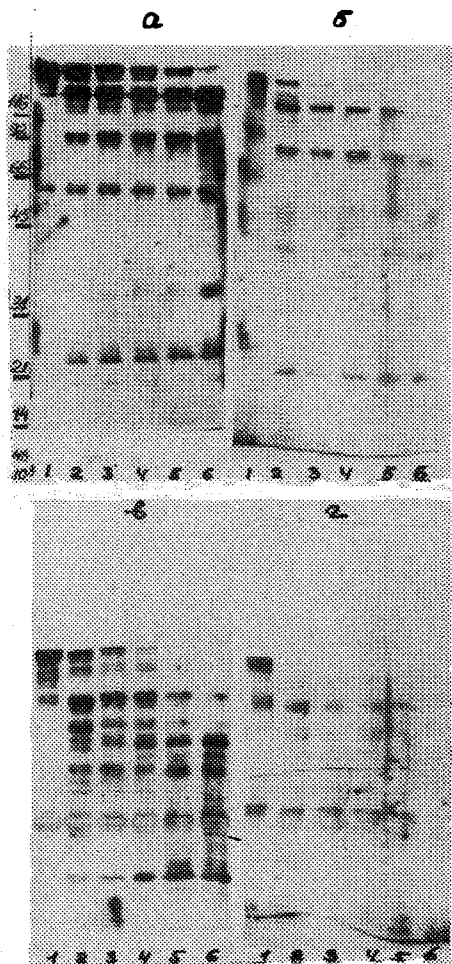


Рис. 2. Анализ папаино-
вых фрагментов IgE в
ДСН-полиакриламидном ге-
ле. IgE(Ю) (а,в), IgE
(IWE) (б,с). Дорожка I
- исходные белки. Доро-
жки 2,3,4,5,6 через
15 мин, 30 мин, 1 час,
3 часа, 24 часа (соот-
ветственно) после до-
бавления фермента к ре-
акционной смеси.

а и б - в отсутст-
вии, в и г - в присутс-
твии 2-меркаптоэтанола,
соответственно.

Справа указано положе-
ние стандартных белков
с известным молекуляр-
ным весом. (Окраска се-
ребром).

Для идентификации протеолитических фрагментов применяли метод иммуноблоттинга с использованием кроличьей антисыворотки к CH_2 домену IgE (ДАКО). На рис. 3 представлена картина, полученная после переноса из геля электрофоретически разделенного препарата IgE, обработанного папаином, и инкубации мембраны с кроличьими антителами к IgE, а затем - с антикроличьими антителами, связанными с пероксидазой и визуализации с помощью ДАБ (диаминобензидин).

Как видно из рис. 3а (дорожки 1-6) кроличьи антитела выявляют 2 протеолитических фрагмента молекулы IgE (IWE) с молекулярной массой 95 и ~32 кД.

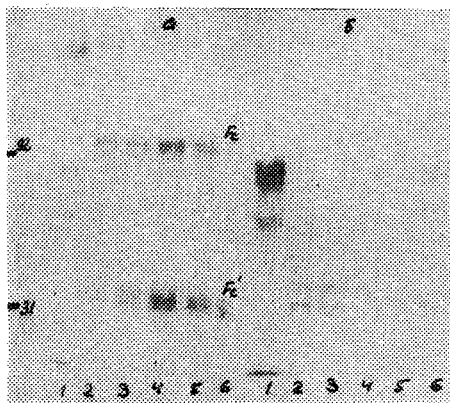


Рис. 3. "Western-Blot" анализ с использованием IgE(IWE) (условия переваривания папаином те же, что на рис. 2) и кроличьей антисыворотки к IgE (ДАКО).

Так как CH_2 домен входит в Fc фрагмент IgE, то фрагмент с молекулярной массой 95 кД - это Fc, а фрагмент с молекулярной массой 32 кД - Fc', что соответствует литературным данным.

Далее мы проделали аналогичную работу с моноклональными антителами и поликлональным асцитом, полученным при иммунизации мышей IgE (Ю). На рис. 4 представлены папаиновые фрагменты молекулы IgE, выявляемые смесью антител IgE/11-1,2,3,4,5.

Следующим этапом работы было изучение взаимодействия отдельных моноклональных антител с протеолитическими фрагментами IgE. На основании рис. 5 можно сделать вывод, что анти-

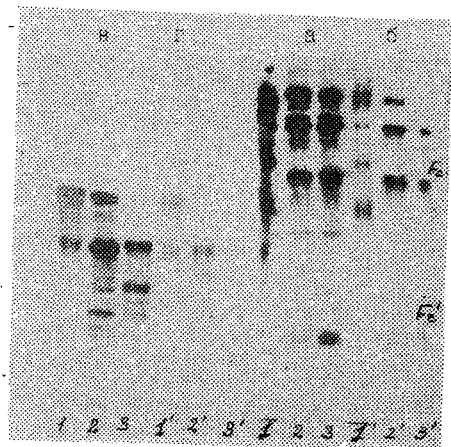


Рис. 4. "Western-Blot" анализ с использованием IgE (D) и IgE(IWE) (условия те же что на рис. 2, но дорожка 2 - 3 часа, дорожка 3 - 24 часа переваривания папаином) и смеси МКА IgE/11-1 - IgE/11-5.

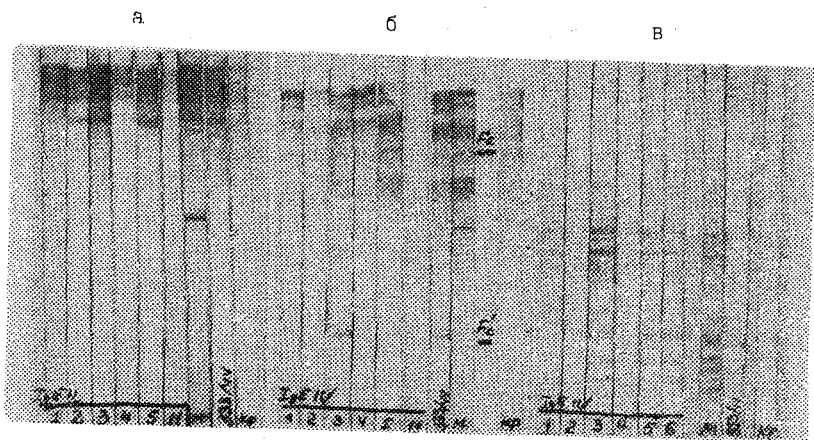


Рис. 5. Анализ взаимодействия индивидуальных МКА серии IgE/11 с нативной молекулой IgE (а) и с молекулой, обработанной папаином в течение 24 часов (б и в) в присутствии 2-меркаптоэтанола (в) и в его отсутствии (б). Номера I, 2, 3, 4, 5, 6, II - соответствуют номерам МКА серии IgE/11; 333/44 - МКА фирмы "Behring". К - кроличьи антитела (ДАКО). М - мышинные поликлональные антитела к IgE.

тела IgE/11-3,5,6 и МКА 333/44 ("Behring"), используемые в коммерческих наборах для определения IgE, дают сходную картину взаимодействия как с нативной молекулой IgE (рис. 5а), так и с папаиновыми фрагментами молекулы миеломного белка (рис. 5б), как в восстанавливающих (рис. 5в), так и в невосстанавливающих (рис. 5б) условиях. Специфичность этих трех МКА подобна кроличьим антителам (ДАКО) против CH_2 домена IgE (рис. 3а). Фрагмент с молекулярной массой 32 кД, выявляемый этими антителами, соответствует по литературным данным фрагменту Fc' IgE. Антитела 333/44 подобны по специфичности этим трем нашим антителам (рис. 5а, в - дорожка 8; б - дорожка 7). Антитела IgE/11-1,2,4 (рис. 5, дорожки 1, 2, 4) отличаются от антител IgE/11-3,5,6 (рис. 5, дорожки 3, 5, 6). Антитело IgE/11-2 отличается от IgE/11-1 и IgE/11-4.

С продуктами переваривания IgE трипсином получены аналогичные результаты.

Таким образом, МКА серии IgE/11-1,2,3,4,5 могут быть использованы для препаративного выделения IgE с помощью аффинной хроматографии для целей структурно-функционального изучения молекулы IgE.

На молекуле IgE выявляются по меньшей мере 4 кластера антигенных детерминант, различающихся по взаимодействию с МКА серии IgE/11.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев Р.Г., Юрин Б.Л., Цыциков Э.Н., Галанина О.Е., Омирова Е.Я. // Биотехнология. - 1988 - № 3.
2. Васильев Р.Г., Сердюк О.А., Цыциков Э.Н. // Бюлл. эксп. биол. мед. - в печати.
3. Bennich N., Johansson S.G.O. // Adv. Immunol. - 1971. - V. 13. - P. 1-55.
4. Laemmli U. // Nature. - 1970. - V. 227. - P. 680-685.
5. Neuberger M.S.T.G., Williams E.B., Mitchell S.S., Yöühal Y.G. // Nature. - 1985. - V. 314. - P. 268.
6. Stefani D.V., Gusev A.J., Mokeeva R.A. // Immunochemistry. - 1973. - V. 10. - P. 559-561.

СКРИНИНГ КЛОНОВ *E.coli* НА СОДЕРЖАНИЕ РНКазы Н МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

В.В.Смолянинов, А.П.Калужная, Г.В.Шехватова, М.И.Болезнин

ВНИИ прикладной микробиологии, п. Оболенск Московской обл.

В связи с отсутствием в нашем распоряжении штамма *E.coli*, обладающего способностью продуцировать повышенные количества РНКазы Н, было проведено молекулярное клонирование гена фермента в плазмиде pBR322. Хромосомную ДНК *E.coli* MRE600 гидролизовали эндонуклеазами *EcoRI* и *PvuI*. Из полученного набора фрагментов ДНК с помощью электрофореза в 1 % геле агарозы с последующей элюцией выделяли те фрагменты, которые имели длину от 1500 до 2500 т.п.н. По литературным данным ген РНКазы Н содержит 760 нуклеотидов.

ДНК pBR322 также расщепляли сайт-специфическими эндонуклеазами *EcoRI* и *PvuI*, фрагменты дефосфорилировали с помощью щелочной фосфатазы из *T.thermophilus*, смешивали с нужными фрагментами хромосомной ДНК *E.coli* и лигировали с помощью T4 ДНК-лигазы. Полученными гибридными молекулами ДНК трансформировали клетки *E.coli* С600. Трансформанты отбирали по устойчивости к тетрациклину и чувствительности к ампициллину. Было получено 2000 клонов. Анализ клонов *E.coli* на содержание РНКазы Н проводили методом ELISA. Для этого на иммунологические платы наносили моноклональные антитела (МКА) к РНКазе Н в количестве 4-8 мкг/50 мл в TBS (50 мМ трис-НСl, 200 мМ NaCl, pH 7,4) и оставляли на ночь при +4° С. Раствор антител отбирали из ячеек (его сохраняли для повторного нанесения). В ячейки платы добавляли по 150 мкл 10 % эмбриональной сыворотки (блокирующий раствор), инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Блокирующий раствор удаляли из ячеек и вносили в них по 50 мкл тестируемых растворов (лизаты исследуемых клонов *E.coli*), после чего оставляли на ночь при +4° С. Затем из ячеек удаляли тестируемые растворы, 5-6 раз промывали ячейки 200 мкл 5 % эмбриональной сыворотки. В ячейки добавляли 50 мкл (4-8 мкг) меченных пероксидазой МКА к РНКазе Н (МКА, первично нанесенные на платы, должны отличаться по детерминанте от меченных антител) или поликлональных антител к РНКазе Н. Платы оставляли при комнатной температуре во влажной камере

на 4-6 часов. Из ячеек удаляли меченые антитела и отмывали ячейки 6 раз раствором TBS (по 200 мкл в ячейку). Затем в ячейки добавляли субстрат (перекись водорода) и краситель ABTS (2,2'-азино(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат)), приготовленные следующим образом: 1,0 мг ABTS растворяют в 2,5 мл 0,05 М цитратного буфера, pH 4,0 и добавляют 10 мкл 0,1 % раствора перекиси водорода. В ячейки добавляют по 100 мкл этой смеси. Окраска в ячейках развивается в течение 30-120 мин (платы можно оставить при +4° С на ночь). Платы сканировали на сканере "Titertek" при 405 нм. Было исследовано 2000 клонов *E. coli*, из которых было отобрано 5 клонов, продуцирующих повышенные количества РНКазы Н (в 10 раз относительно контрольных штаммов *E. coli*). Из отобранных клонов выделяли ДНК, расщепляли эндонуклеазами *EcoRI* и *PvuI* и исследовали в 1 % геле агарозы. Из этих же штаммов проводили наработку фермента.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИЛТРАНСФЕРАЗЫ (tdt) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

В.В.Смолянинов, А.П.Калужная, Г.В.Шехватова, Л.Н.Гусева
ВНИИ прикладной микробиологии, п. Оболенск Московской обл.

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (tdt) - фермент, катализирующий присоединение дезоксинуклеотидов к 3'-ОН концу олиго- или полидезоксинуклеотидов в отсутствии матрицы. В нормальных тканях терминальная трансфераза обнаружена только в клетках тимуса и костного мозга. Тимоциты содержат около 5 мкг фермента на 10⁹ клеток. В костном мозге содержится примерно 1 % tdt от концентрации в тимусе. Высокое содержание терминальной трансферазы было обнаружено в лимфобластах пациентов с острой лимфобластной лейкемией и лейкоэмических клетках больных миелогенной лейкемией в бласт-кризе. Поэтому понятен интерес исследователей к этому ферменту при диагностике некоторых опухолевых заболеваний лимфоидной системы.

Нами были получены моноклональные антитела (МКА) к терминальной трансферазе из тимуса теленка, которые продуцируются

тремя разными гибридными клонами и различаются по антигенной детерминанте. Была также предпринята попытка обнаружения терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы в сыворотке крови человека с помощью этих антител. Для этого лимфоциты (концентрация клеток в пробе составляла 1×10^9 кл/мл) разрушали замораживанием и оттаиванием, клеточные обломки удаляли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 40 мин при $+4^\circ \text{C}$, супернатант использовали для тестирования методом ELISA. Было обнаружено, что МКА двух клонов не дают положительной реакции с терминальной трансферазой человека, а один клон дает ярко выраженную положительную реакцию. Таким образом, эти МКА можно использовать при диагностике заболеваний лимфоидной системы.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К МИОГЛОБИНУ В МОНИТОРИНГЕ БОЛЬНЫХ С НАРУШЕНИЕМ КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ КОНЕЧНОСТЕЙ

Б.Г.Торопова, А.В.Глебов, Э.И.Юронен*

НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова Минздрава СССР,
Ленинград

*НИИ общей и молекулярной патологии Тартуского
государственного университета

Острые тромбозы и эмболии магистральных артерий, возникающие при ишемической болезни, сопровождаются нарушением трофики тканей, в том числе мышечной. Вследствие этого происходит поступление в кровоток миоглобина - специфического белка мышечной ткани. Об этом свидетельствует уже применяющееся в клинике определение миоглобина в сыворотке крови человека для диагностики различных заболеваний, например, инфаркта миокарда [3,4], прогрессирующей мышечной дистрофии, выраженной почечной недостаточности [7], а также при изучении адаптации к физическим нагрузкам [2,5]. В этой связи особый интерес представляет количественный анализ миоглобина, концентрация которого, как можно предположить, будет отражать тяжесть заболевания, динамику его течения и служить контролем за эффективностью лечения.

Одной из часто встречаемых у человека патологий является ишемическая болезнь нижних конечностей (облитерирующий атеросклероз, эндоартериит и др.). В данной работе приводятся результаты определения концентрации миоглобина в сыворотке крови таких больных.

Для определения концентрации миоглобина в сыворотке крови больных был применен твердофазный иммуоферментный анализ в "сэндвич"-варианте. Выделение миоглобина проводили по методу [1]. Смесь полученных ранее моноклональных антител (МКА) к 6 различным эпитопам миоглобина [6] при концентрации каждого 0,9 мкг/мл иммобилизовали на полистироловых планшетах фирмы Dynatech в буфере А (0,01 М Na,K-фосфат, 0,15 М NaCl, 0,02 М KCl, pH 7,4). После инкубации в течение 15-18 ч при 4° С и отмывки буфером В (0,01 М Na,K-фосфат, 0,5 М NaCl, 0,02 М KCl, 0,1 % Твин-20, pH 7,4) вносили в лунки по 10 мкл сыворотки или стандартного раствора миоглобина и 90 мкл смеси меченых пероксидазой хрена МКА, разведенных на буфере В в предварительно подобранном рабочем титре. Образцы и конъюгат инкубировали в течение 2-х ч при 37° С и после отмывки планшетов от несвязавшихся реагентов вносили в лунки по 100 мкл субстратной смеси (0,015 % раствора H₂O₂ и 0,05 % раствора ортофенилендиамина в 0,1 М цитратно-фосфатном буфере, pH 5,0). Через 5 мин реакцию останавливали добавлением в каждую лунку по 100 мкл 12,5 % серной кислоты. Интенсивность окрашивания измеряли фотометрически при длине волны 490 нм на спектрофотометре Мультискан МСС (Flow, Англия). Стандартную калибровочную кривую получали, используя очищенный миоглобин, разведенный на аффинноочищенной от эндогенного миоглобина сыворотке доноров.

Использованная система определения концентрации миоглобина в сыворотке крови была оптимизирована в отношении разведения тестируемых сывороток крови (рис. 1). Так, при использовании для разведения миоглобина цельной сыворотки, линейная зависимость между концентрацией миоглобина и величиной экстинкции нарушается. Кроме того, наклон кривой невелик, что не обеспечивает точности определения. При разведении сыворотки буфером В в соотношениях 1:50 и 1:100 чувствительность метода крайне низка; максимальное превышение над фоном даже при достаточном высоком содержании миоглобина не превы-

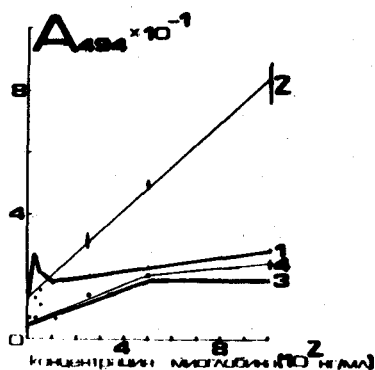


Рис. 1. Калибровочные кривые для определения концентрации миоглобина в сыворотке крови человека при различных разведениях сыворотки.

- 1 - без разведения;
- 2 - разведение 1:10;
- 3 - разведение 1:50;
- 4 - разведение 1:100.

шает 2. Только при разведении сыворотки в 10 раз наблюдаются оптимальный наклон кривой, позволяющий наиболее корректно определять по ней уровень миоглобина.

Также была проведена стандартизация условий хранения сывороток в процессе их накопления, что особенно важно при анализе уровня миоглобина у одних и тех же больных в процессе лечения. Оптимальными оказались следующие условия: $+4^{\circ}\text{C}$ в присутствии 0,005 М этилендиамин тетрауксусной кислоты, 0,001 М фенилметилсульфанилфторида и 0,01 % мертиолята.

У здоровых лиц обоего пола концентрация миоглобина в сыворотке крови составляла 57 ± 3 нг/мл при данных условиях тестирования. Выявлена прямая зависимость между уровнем миоглобина в кровеносном русле и степенью ишемии конечностей (табл. I). В общем кровотоке (кровь брали из локтевой вены) уровень миоглобина возрастает в несколько раз по мере прогрессирования заболевания. Различия между содержанием миоглобина при разных стадиях ишемии статистически достоверны ($P < 0,01$). В результате анализа проб, взятых из регионарного кровотока, получена та же закономерность. Вместе с тем, содержание миоглобина в регионарном кровотоке существенно выше, чем в общем кровотоке ($P < 0,05$). Различия становятся еще более заметными при II и III степени ишемии.

Таким образом, концентрация миоглобина при ишемической болезни в общем и регионарном кровотоке может служить доста-

Таблица I

Содержание миоглобина (нг/мл) в общем и регионарном кровотоке

Концентрация миоглобина (нг/мл)	Степень ишемии		
	I	II	III
Общий кровоток (локтевая вена)	98±22	375±98	2225±938
Регионарный кровоток (из пораженной конечности)	164±15	949±208	4334±912

точно надежным показателем тяжести процесса. Полученные нами предварительные данные о динамике изменения уровня миоглобина в процессе хирургического лечения таких больных, способствующего восстановлению кровоснабжения тканей, свидетельствуют о том, что определение миоглобина может быть использовано для контроля за эффективностью лечения.

Предложенный метод определения миоглобина расширяет сферу применения МКА к нему в практической медицине.

Авторы выражают благодарность Квитко А.Ф. (ЛГСМИ им. И.И. Мечникова, Ленинград) за предоставленный клинический материал.

ЛИТЕРАТУРА

1. Домбровский В.И., Поверенный А.М. // Вопр. мед. химии. - 1981 - № 4. - С. 566-568.
2. Осипов С.Г., Бабаян Г.В., Ермолин Г.А. и др. // Лаб. дело. - 1986. - № 9. - С. 550-553.
3. Соловьев А.В., Ермолин Г.А., Диков М.М. // Тер. архив. - 1986. - № 3. - С. 38-39.
4. Ташматова А.Ю., Староверов И.И., Титов В.Н., Руда М.Я. // Лаб. дело. - 1986. - № 3. - С. 145-149.
5. Чайковский В.С., Башарина О.Б., Шалапина И.В., Рогозкин В.А. // Вопр. мед. химии. - 1987. - Т. 33. - № 4. - С. 79-83.
6. Кронен Э.И., Пийрсоо А.О., Микельсаар А.-В.Н. // Мат. Респ. конф., Тарту. - 1986. - С. 19-23.

7. Stone M.G., Willerson J.I. // Int. J. Cardiol. - 1983. - V. 4. - No. 1. - P. 49-52.

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ С ПОМОЩЬЮ СЛОЖНЫХ АНТИГЕННЫХ КОМПОЗИЦИИ

А.В.Трофимов, С.А.Синева, А.М.Пивоваров, И.А.Блинова,
С.В.Андреев, А.М.Ищенко, Л.А.Кузьмина, Л.Я.Соловьева,
Е.А.Карабанова, Т.О.Антипова, Л.П.Коробицын

ВНИИ особо чистых биопрепаратов Минмедбиопрома СССР,
Ленинград

Традиционные подходы к получению гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКА), предполагают использование для иммунизации животных, как правило, гомогенных или близких к гомогенности антигенов. Однако в результате очистки свойства антигенов могут меняться из-за частичной или полной денатурации, что сужает возможности отбора целевых гибридом и снижает значимость соответствующих МКА. В настоящей работе представлены данные по получению гибридом, продуцирующих МКА к компонентам нативной сыворотки крови человека, которая использовалась в качестве иммуногена без предварительных обработок. Чрезвычайная сложность этой естественной биологической смеси позволила получить в одном акте слияния широкий спектр различных гибридом.

Материалы и методы. Мышей линии BALB/c иммунизировали в подушечки задних лап, вводя по 50 мкл пулированной нормальной сыворотки человека (НСЧ) в полном адъюванте Фрейнда (1:2 частям, соответственно). Спустя 3 месяца животных бустировали 30 мкл НСЧ внутривенно. Иммуноциты из паховых лимфоузлов и селезенки отбирали на 3-й, 5-й, 7-й и 12-й дни после бустера, их слияние с миеломными клетками линии Sp2/0 или Pх63.Ag8.653 проводили по стандартной методике с использованием полиэтиленгликоля [1].

Для отбора клонов-продуцентов применяли твердофазный иммуноферментный анализ на разнообразных антигенах, очищенных во ВНИИ ОЧБ. с3 компонент комплемента получали методом иммуно-

аффинной хроматографии на иммобилизованных МКА LBPG10; c1q - методом аффинной хроматографии на IgG-сефарозе с последующей очисткой гельфильтрацией; c4, c5 и c9 - комбинацией ион-гидрофобной и ионообменной хроматографии. Последний метод разработан сотрудниками института Л.Я.Соловьевой, Е.А.Карабановой и Т.О.Антиповой с использованием сорбентов типа "Солоза". Фактор Н получали из эуглобулиновой фракции НСЧ с последующей ВЖХ на колонках типа TSK 545 DEAE и TSK G4000 SW. Все перечисленные компоненты системы комплемента имели чистоту не менее 80-95 % в SDS-ПААГ электрофорезе. Качество очистки контролировали методом иммуноэлектрофореза с коммерческими антисыворотками к c3, c4, c5, c9, Н и c1q компонентам комплемента (Calbiochem), а также на гемолитическую активность с использованием дефицитных по c3, c5 и c1q сывороток. Характеристики человеческих иммуноглобулинов представлены в работе А.М.Пивоварова и др. [2]. МКА нарабатывали внутрибрюшинным пассивированием гибридных клеток в мышах линий BALB/c и DBA. Специфичность МКА доказывали в иммуноблоттинге и методом иммуноаффинной хроматографии.

Результаты. Исследование иммунного ответа животных после бустера НСЧ выявило наличие высоких титров антител к иммуноглобулинам, c1q и c3 компонентам комплемента; реакция на c4, c5 и c9 компоненты была более слабой и наблюдалась не у всех особей. В связи с этим слияния проводили со смесью иммуоцитов от нескольких мышей. Каждую ячейку с подросшими клонами скринировали на всем спектре антигенов.

Всего отобрано 33 стабильных гибридных продуцента, характеристики которых приведены в таблице I. Иммуноблоттинги, доказывающие специфичность некоторых из них, приведены на рисунках 1-4. Для установления специфичности некоторых других МКА использовали идентификацию очищенных с их помощью на иммуноаффинной колонке антигенов соответствующими коммерческими сыворотками. В случае гибридом к α - и λ -цепям человеческих иммуноглобулинов уточнить специфичность позволили МКА, любезно предоставленные В.Б.Климовичем (ЦНИРИ), а также набор реагентов фирмы Dakopatte.

Таблица I

Характеристика МКА полученных гибридом

Название клона	Изотип проду- цируемых МКА	Специфичность	Какими методами до- казана специфичность
1	2	3	4
H1C2	G1	λ-цепи иммуно- глобулинов че- ловека	ИФА, иммуноаффинная хроматография
H2E10	G1	α-цепь иммуно- глобулинов че- ловека	- " -
H8C3	G2b	- " -	- " -
H3E9	G2b	IgG1, 2, 3, 4	- " -
H8G5	G2a	- " -	- " -
H9H3	H/O	IgA	ИФА
H12H1	G1	- " -	- " -
H13H2	G2a	- " -	- " -
H14A9F1	H/O	IgG3	ИФА
H2B3	G1	C1q	ИФА, иммуноблоттинг
H3F9	M	- " -	- " -
H8E4	M	- " -	- " -
H4F5	G1	C3d	ИФА, иммуноблоттинг, тест на подавление МКА гемолитической активности C3 ком- понента компонен- та, которая лока- лизирована в области C3d фрагмента
H9H11	G1	C4, нативная структура	ИФА, иммуноблоттинг
H9A9	G2a	C4, γ-цепь	- " -
H10A3	G2a	C4, β-цепь	- " -
H32A6	G1	C5, нативная структура	ИФА, иммуноблоттинг
H37G12	G1	C5, α-цепь	- " -
H37D2	G1	C5, α-цепь	- " -
H11H11	G1	фактор н	ИФА, иммуноблоттинг
H12H9	G2a	фактор н	- " -
H8C2	G2b	IgG1, 2, 4	ИФА

(продолжается)

Продолжение таблицы I

I	2	3	4
H1D7	G1	предположительно С1-инактиватор	ИФА, иммуноаффинная хроматография, выделен белок ММ 100 кД
H2B10	G1	- " -	- " -
H14A9D4	G2a	C9	
H10A5	H/O	фракция макроглобулинов	ИФА, иммуноблоттинг
H10A11D10	G1	- " -	- " -
H12A1E6	G1	- " -	- " -
H12E11	H/O	- " -	- " -
H14C6	G1	- " -	- " -
H15B11	G1	- " -	- " -
H16E6	G1	- " -	- " -
H12C1	H/O	- " -	- " -
H10H2	H/O	- " -	- " -

Таким образом, иммунизация мышей сложной антигенной смесью позволила получить в одном слиянии широкое семейство гибридом, продуцирующих МКА к важным и интересным с точки зрения диагностики компонентам человеческой сыворотки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Osterhaus A., Naaj F.U. // Animal Cell Mol. Biotech. - 1985. - V. 2. - P. 49-69.
2. Пивоваров А.М., Трофимов А.В., Арапова Л.Ф., Синева С.А., Блинова И.А., Коробицын Л.П. // Мат. Всесоюзной конф. "Генная и клеточная инженерия в решении фундаментальных проблем биотехнологии", Тарту, 1989. - Т. II - С. 80-88.

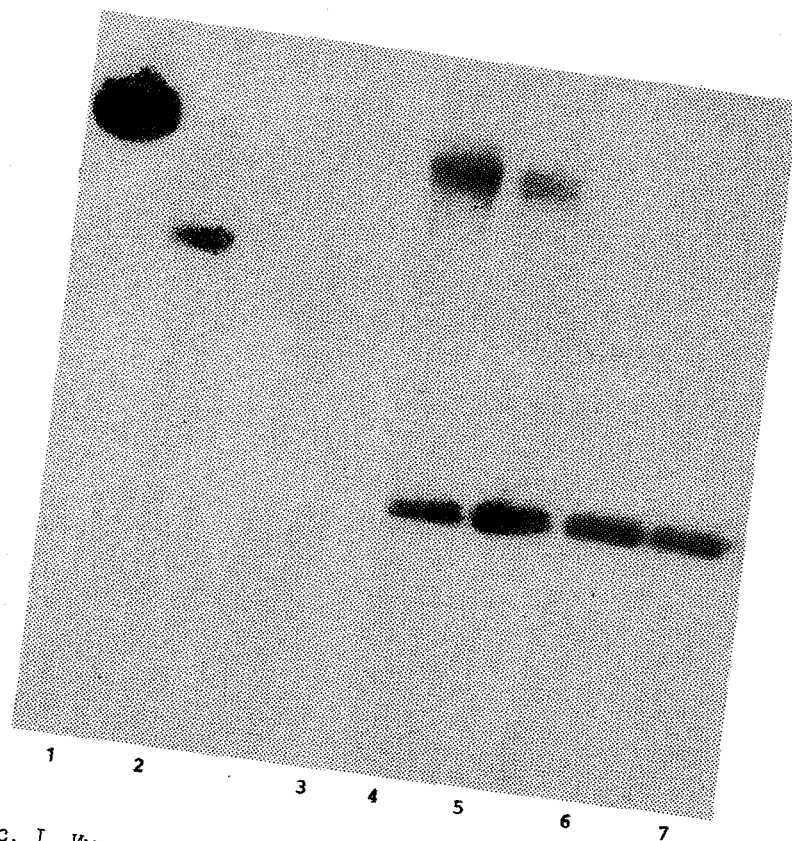


Рис. 1. Иммуноблоттинг с3 компонента комплемента человека с МКА Н4F5. 1 - с3 цельный; 2 - с3 + β -меркаптоэтанол; 3 - с3а; 4, 5, 6 и 7 - с3, обработанный трипсином в течение 2, 10, 60 и 120 минут, соответственно.

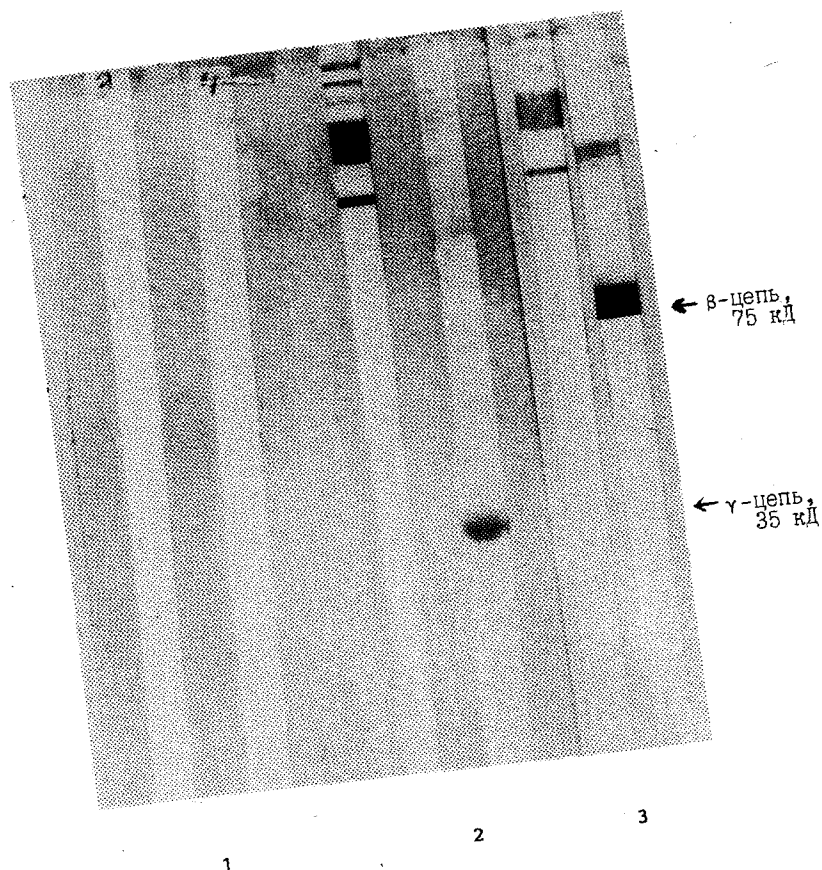


Рис. 2. Иммуноблоттинг с4 компонента комплемента человека с МКА гибридом: 1 - н9н11; 2 - н9а9; 3 - н10а3.

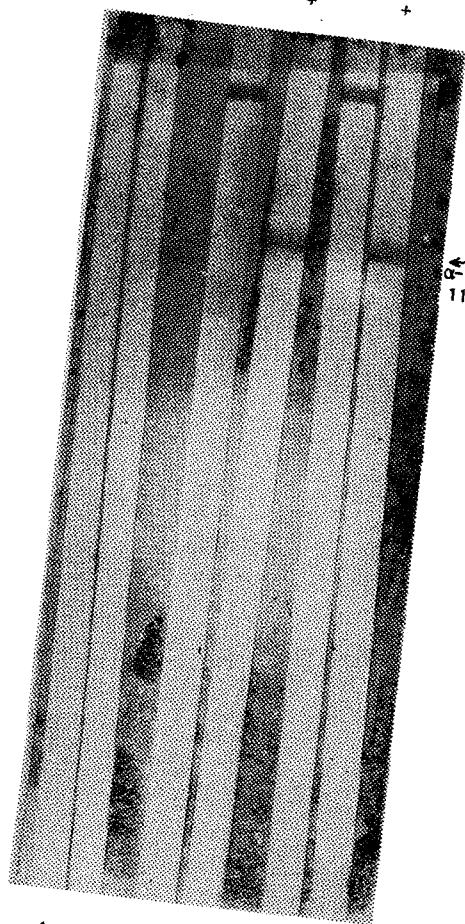


Рис. 3. Иммуноблоттинг с5 компонента комплемента с МКА гибридом: 1 - H32A6; 2 - H37G12; 3 - H37D2.

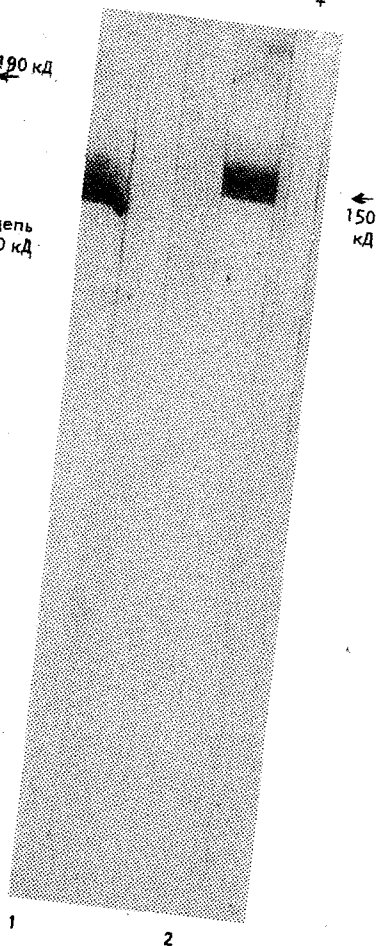


Рис. 4. Иммуноблоттинг фактора H системы комплемента человека с МКА гибридом: 1 - H11H11; 2 - H12H9.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАБОРОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИОГЛОБИНА НА ОСНОВЕ МОНО- И ПОЛИКЛО- НАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФАРКТА МИОКАРДА

М.М.Уускула, Э.И.Юронен, К.М.Ламп, М.Х.Пааво

НИИ общей и молекулярной патологии Тартуского
госуниверситета

В последние годы в ряде работ показана возможность ранней диагностики инфаркта миокарда (ИМ) с помощью определения содержания миоглобина (МГ) в сыворотке крови [3,5,7]. Так, установлено, что у больных острым ИМ содержание МГ повышается уже спустя 1-2 ч после начала болевого приступа [11], что заметно опережает возрастание ферментативной активности при поражении сердечной мышцы [4]. Учитывая данные, указывающие на коррелятивные связи между миоглобинемией и размером некроза [2,5,10], разработка новых и чувствительных методов определения МГ имеет несомненное значение для ранней диагностики ИМ, а также для оценки эффективности ограничивающего некроз лечения. В нашем институте разработан новый метод для определения МГ на основе использования моноклональных антител к миоглобину, результаты клинической апробации которого мы здесь и приводим.

МГ был определен в крови у 184 больных крупноочаговым ИМ, у 48 больных стенокардией без перенесенного ИМ в анамнезе и у 10 больных хронической формой ишемической болезни сердца (ИБС) после катетеризации сердца, находившихся на лечении в инфарктном отделении Тартуской клинической больницы. Первичный ИМ был у 149, повторный ИМ - у 35 больных. Диагноз поставлен на основании критериев ВОЗ 1970 г. по данным динамического клинического и электрокардиографического обследования и результатам повторного определения активности ферментов (трансфераз (АсАТ, АлАТ), креатинкиназы (КФК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ)).

Уровень МГ определяли тремя методами:

1. Радиоиммунологический ($МГ_{РИА}$) - Новосибирский институт органической химии СО АН СССР, "Радиоприбор", Ташкент [6].

2. Эритроцитарный гемагглютинационный ($МГ_{Эр}$) - "Диагнос-

тикум для выявления МГ эритроцитарный иммуноглобулиновый сухой", Горьковский НИИ эпидемиологии и микробиологии.

3. Метод определения МГ с помощью набора на основе моноклональных антител (МГ_{МКА}) - [8].

Нормальным считали уровень содержания МГ до 80 нг/мл, при МГ_{Эр} этому показателю соответствовало наличие агглютинации в титре 1:2-1:64.

Кровь брали в большинстве случаев через катетер, установленный в подключичной вене, а в отдельных случаях из локтевой вены. Число исследований, проведенных в определенные сроки от начала заболевания (болей) при ИМ, приведено в табл. I.

Таблица I

Число проведенных исследований содержания миоглобина и время от начала заболевания (болей) при ИМ

Время определения миоглобина в зависимости от начала ИМ в ч	Число определений миоглобина
2	I4
4	II
6	15
8	I8
10	21
12	16
14	13
16	18
18	14
20	19
24	31
48	28
72	29
72 и более	46
Всего:	293

Показатели содержания МГ в сыворотке крови больных ИМ в зависимости от использованного метода в разные сроки болезни в динамике приведены в табл. 2, откуда видно, что в содержа-

Таблица 2

Содержание миоглобина в сыворотке крови
больных ИМ (в нг/мл)

Метод	Время от начала ИМ					
	2 ч	6 ч	10 ч	16 ч	24 ч	48 ч и более
МГ _{МКА}	186±24	287±39	311±28	431±34	207±29	76±12
МГ _{Эр}	257±38	403±82	524±79	589±66	296±61	123±27
МГ _{РИА}	146±27	204±19	207±24	255±38	140±27	68±12

нии МГ у этих больных отмечается определенная динамика. Уже в первые часы болезни содержание МГ превышало норму в два-три раза, а пик повышения МГ (при всех использованных методах) приходился на 16 ч от начала болей, в то время как пик повышения КФК - на конец первых суток, а максимальный подъем АсАТ - в течение вторых суток. Таким образом, выявление повышения содержания МГ в сыворотке крови при некрозе миокарда является наиболее ранним биохимическим методом диагностики ИМ.

У 6 больных в острой стадии ИМ проведена тромболитическая терапия (у 4-х - внутривенно, у 2-х - внутрикороноарно). Как известно, успешному тромболизу и частичному восстановлению коронарного кровотока сопутствует резкое повышение активности трансфераз и КФК. Оказывается, как показали наши результаты, у трех больных ИМ из 6, которым проводили тромболитическое лечение авелизином (ГДР), наряду с повышением АсАТ и КФК, отмечалось и резкое повышение уровня МГ (до 800 нг/мл). У тех же больных отмечалось более быстрое электрокардиографическое и клиническое улучшение. Этим наши результаты подтверждают данные А.А.Смирнова (1988) о возможности использования определения МГ, как показателя восстановления коронарного кровотока.

Содержание МГ у больных стенокардией составляло в среднем 71 ± 18 нг/мл, число клинически необоснованного повышения содержания МГ статистически не отличалось при использованных нами различных методах. Число "ложноположительных" проб при МГ_{РИА} было 6 из 48, при МГ_{Эр} - 7 из 48, при МГ_{МКА} - 9 из 48 больных стенокардией.

Наши результаты не подтвердили данные о повышении уровня МГ после катетеризации сердца [9]. Так, содержание МГ у 10 больных ИБС после катетеризации было в пределах нормы (37 ± 12 нг/мл).

Таким образом, определение повышения содержания МГ в сыворотке крови при ИМ является ценным диагностическим показателем некротического поражения сердечной мышцы. Повышение МГ при других мышечных поражениях, как травмы, миастения, не затрудняет дифференциальную диагностику ИМ, поскольку здесь помогает клиническая картина, а при внутримышечных инъекциях уровень МГ не превышает норму [7]. Вопрос о положительных тестах повышения МГ при стенокардии требует дальнейшего исследования.

Наши результаты не дают основания для предпочтения той или иной методики определения МГ в сыворотке крови. Надо отметить, что для клиницистов первостепенную важность имеет получение быстрого, чувствительного и нетрудоемкого определения МГ. Известно, что повышение уровня МГ у больных ИМ происходит уже в течение 30 минут от начала болезни, а установить это можем пока лишь спустя 2-5 часов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнов А.А. // Бюл. Всесоюзн. кардиол. научн. центра. - 1988. - № 1. - С. II2-II3.
2. Ташматова А.Ю., Староверов И.И., Титов В.Н. и др. // Кардиология. - 1986. - № 2. - С. 56-61.
3. Уускула М.М. // Здравеохранение Сов. Эст. - 1984. - № 2. - С. 96-98.
4. Филиппов И.К., Титов В.Н., Маслова И.А. и др. // Лаб. дело. - 1980. - № 12. - С. 730-733.
5. Шурыгин Д.Я., Шишмарев Ю.Н., Грачев А.М. // Сов. мед. - 1982. - № 5. - С. 62-65.
6. Grachev M.A., Matvejev L.E., Pressman E.K., Roschke V.V. // Clin. Chim. Acta. - 1982. - V. 124. - P. 235-238.
7. Hertzeanu H., Hertzeanu I., Almog Ch., Zaidman I. // Acta Cardiol. - 1982. - V. 37. - P. 257-268.
8. Juronen E.I., Viikmaa M.H., Mikelsaar A.-V.N. // J. Immu-

- mol. Meth. - 1988. - V. 111. - P. 109-115.
9. McComb J.M., McCaster E.A. // Br. Heart J. - 1982. - V. 47. - P. 353-356.
10. Tommaso C.L., Salzeider K., Arif M., Klutz W. // Am. Heart J. - 1980. - V. 99. - P. 149-154.
11. Venge P. // Uppsala J. Med. Sci. - 1983. - V. 88. - P. 205-211.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ТОПОГРАФИЧЕСКИМ И СЕКВЕНЦИАЛЬНЫМ ЭПИТОПАМ МИОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

Э.И.Юронен, А.-В.Н.Микельсаар, М.Г.Вийкмаа, Ю.Р.Сийгур*

НИИ общей и молекулярной патологии Тартуского государственного университета, *Институт химической и биологической физики АН ЭССР, Таллинн

Миоглобин как белок с хорошо изученной первичной и пространственной структурой широко используется в качестве модельного белка для изучения многих фундаментальных проблем, в том числе реакций антиген-антитело, а в последнее время он стал и объектом для изучения антигенной структуры белка. На миоглобине кашалота доказано существование двух типов антигенных детерминант: секвенциальных и топографических [1,2]. Выявление у кашалота закономерностей антигенных свойств миоглобина вызывает вопрос об их специфичности и общebiологическом значении. В связи с этим представляет большой интерес молекулярно-иммунологическое исследование миоглобина других животных, в том числе и человека.

Материалы и методы

Моноклональные антитела. Получение моноклональных антител, их очистка, конъюгирование с пероксидазой и определение эпитопной специфичности описано ранее [10]. В данной работе использовались моноклональные антитела (МКА) к 6 разным эпитопам: 4A1.1, 4C1.2, 5C4.1, 3D8.5, 4C8.11 и 1H3.2.

Проведение прямого иммуноферментного анализа с апомиоглобином и миоглобинами разных животных. Апомиоглобин был получен по ранее описанному методу [4], а миоглобин кашалота, ло-

шади и собаки от фирмы Sigma Chemical Co., США. Для проведения иммуноферментного анализа в лунки полистироловых пластинок (Nuncion, Дания) добавляли растворы миоглобина и апомиоглобина в ЗФР (100 мкл, 1 мкг/мл). Пластины выдерживали в течение ночи при комнатной температуре, промывали ЗФР с 0,05 % Твин-20 (ЗФРТ) и блокировали лошадиной сывороткой (1:4 в ЗФР) 30 мин при 37° С. После этого пластины промывали ЗФРТ и в лунки добавляли МКА, связанные с пероксидазой в ЗФРТ. Пластины выдержали 90 мин при 37° С, промывали ЗФРТ и в лунки вносили 200 мкл субстратной смеси (0,5 мг/мл о-фенилендиамина и 0,03 % H_2O_2 в 0,1 М цитратфосфатном буфере, pH 5,0). После 30-минутной инкубации реакцию останавливали добавлением 50 мкл 12,5 % серной кислоты. Интенсивность реакции оценивали при 490 нм на автоматическом спектрофотометре Microelisa Auto Reader MR 580 (Dynatech Instruments, США).

Фрагментация миоглобина и иммуноблоттинг. Апомиоглобин расщепляли по карбоксильной группе метиониновых остатков с помощью бромистого циана [8]. 8 мг белка растворяли в 0,5 мл 70 % HCOOH и добавляли 30 мг бромистого циана. Расщепление апомиоглобина по пептидной связи на местах расположения остатков аргинина проводили по ранее описанному методу [13]. Для этого апомиоглобин модифицировали - блокировали остатки лизина цитракониковым ангидридом (Fluka, Швейцария). Модифицированный миоглобин расщепляли с помощью трипсина 2 часа при 37° С. Гидролизат лиофилизировали.

Фрагменты миоглобина разделяли при помощи электрофореза в 8-25 % градиентном полиакриламидном геле с ДСН [5] и провели Вестерн-блоттинг на нитроцеллюлозный фильтр [14]. Часть фильтра окрашивали на общий белок амидочерным Б [6], а остальную часть фильтра блокировали 2 % раствором казеина в ЗФР. Иммуно-реакцию провели с супернатантами гибридомных клонов (20 часов) и с мечеными пероксидазой козьими антимышиными антителами (3 часа).

Результаты и обсуждение

Для детальной характеристики эпитопной специфичности полученных нами МКА к 6 разным эпитопам миоглобина человека была изучена способность этих антител реагировать с апомиоглобином,

миоглобинами разных видов и фрагментами миоглобина.

При обработке миоглобина кислым ацетоном от миоглобина отделяется гем, происходит обратимая денатурация миоглобина, размеры молекулы увеличиваются вдвое [1]. В результате этого значительно изменяется конформация миоглобина: изменяются расстояния между цепями миоглобина, что может привести к разрушению топографических эпитопов. И действительно, наши данные показали, что 4 МКА из 6 связывались с апомиоглобином гораздо слабее, чем с миоглобином (табл. I). Можно предположить, что

Таблица I

Оптические плотности при 490 нм прямого иммун-
ферментного анализа при связывании 6 разных МКА
с миоглобином и апомиоглобином

МКА	Миоглобин	Апомиоглобин
3C1.2	> 1,6	> 1,6
4A1.I	1,461	0,361
4C8.II	0,568	0,239
3D8.5	1,018	0,171
1H3.2	0,385	0,052
5C4.I	1,275	0,953

МКА 4A1.I, 3D8.5, 4C8.II и 1H3.2 связываются с топографическими антигенными детерминантами на поверхности миоглобина. Этот вывод подтверждается и тем, что эти антитела не связываются с фрагментами, образующимися под воздействием бромистого циана (см. рис. I).

МКА 5C4.I и 3C1.2 связывались одинаково хорошо с миоглобином и апомиоглобином, что позволяет предположить их направленность против секвенциальных антигенных детерминантов.

Для проверки этой точки зрения нами изучена способность МКА реагировать с фрагментами расщепления миоглобина бромистым цианом (рис. I). На электрофореграмме ниже маркерного миоглобина видны три белковые зоны, которые соответствуют 4 фрагментам миоглобина: 76 аминокислотных остатков (фрагмент 56-131), 55 аминокислотных остатков (фрагмент I-55) и третью

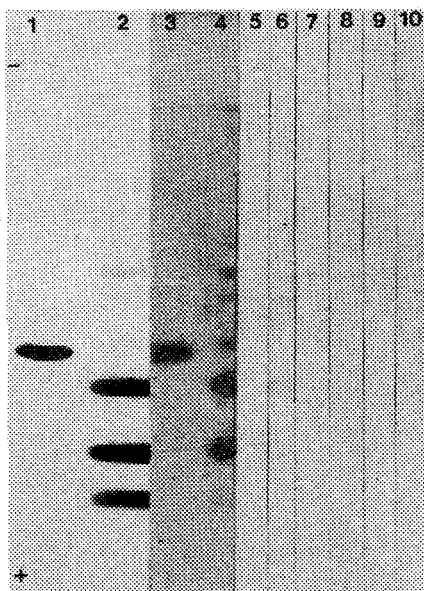


Рис. 1. Иммуноблоттинг фрагментов, образующихся при воздействии бромистого циана: 1,2 - электрофореграмма в 8-25 % градиентном полиакриламидном геле с ДСН; 3,4 - картина иммуноблоттинга, окрашенного амидочерным Б; 5-10 - иммунореакция с МКА.

1,8 - миоглобин;
2,4 - фрагменты миоглобина; 5 - клон 5C4.I;
6 - клон 3C1.2; 7 - клон 4A1.I; 8 - клон 3D8.5; 9 - клон 4C8.II;
10 - клон 1H3.2.

зону образуют два фрагмента по II аминокислотным остаткам (фрагменты I32-I42 и I43-I53), которые в данных условиях электрофореза не разделяются. После проведения иммуноблоттинга выяснилось, что только МКА 3C1.2 связываются с данными фрагментами, точнее с фрагментом миоглобина 56-I3I (рис. 1). Остальные МКА, в том числе антитела 5C4.I, с фрагментами цианбромистого расщепления миоглобина не реагируют. Можно предположить, что в эпитоп, с которым связываются МКА 5C4.I, входит молекула метионина, поскольку белки разрушаются под воздействием бромистого циана по карбоксильной группе метиониновых остатков.

Для более точной характеристики эпитопа МКА 5C4.I проведено расщепление миоглобина при помощи трипсина по пептидной связи аргинина. При этом из миоглобина человека образуется три фрагмента с аминокислотными остатками I-3I, 32-I39 и I40-I53. На электрофореграмме (рис. 2) кроме этих трех фрагментов видны еще две минорные белковые зоны, возникающие при не-

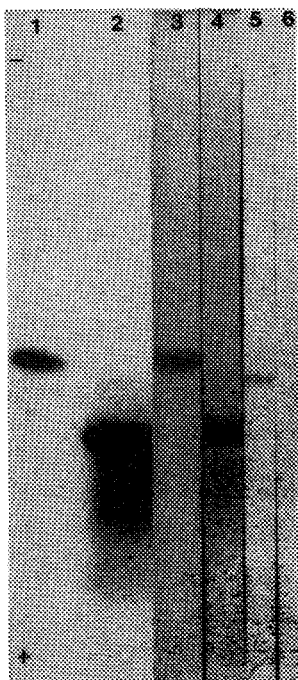


Рис. 2. Иммуноблоттинг трипсиновых фрагментов модифицированного цитраконовым ангидридом миоглобина. 1,2 - электрофореграмма в 8-25 % градиентном полиакриламидном геле с ДСН; 3,4 - картина иммуноблоттинга, окрашенного амидочерным Б; 5,6 - иммунореакция с МКА.

1,3 - миоглобин; 2,4 - трипсиновые фрагменты миоглобина; 5 - клон 3С1.2; 6 - клон 5С4.1.

полном или неспецифическом расщеплении миоглобина трипсином. После проведения иммуноблоттинга выяснилось, что с трипсиновыми фрагментами миоглобина реагирует только МКА 3С1.2, связывающееся с фрагментом 32-139. Антитела 5С4.1 с фрагментами 1-31, 32-139 и 140-153 не связывались, но реагировали в некоторых опытах с продуктами неспецифического расщепления миоглобина трипсином.

Эксперименты по изучению связывания антител с фрагментами миоглобина позволяют сделать некоторые предположения о структуре эпитопа МКА 5С4.1. Поскольку антитела 5С4.1 не связываются ни с одним из фрагментов, образующихся при расщеплении миоглобина по месту расположения метионина и аргинина, то можно предположить, что один из трех остатков метионина и один из двух остатков аргинина входят в состав эпитопа, с которым связываются МКА 5С4.1. По первичной структуре миоглоби-

на человека видно, что он имеет в своем составе остатки аргинина и метионина, расположенные очень близко друг к другу: такими являются аргинин I39 и метионин I42 [11]. Следовательно, высока вероятность, что участок миоглобина с аминокислотными остатками I39-I42 входит в состав эпитопа, который связывает МКА 5C4.1.

Ранее секвенциальные эпитопы были изучены детально у миоглобина кашалота и выявлены следующие антителосвязывающие последовательности: I-6, I4-22, 49-54, 94-99, II3-II9, I2I-I27 и I45-I5I [1,9,12,15]. На миоглобине быка были установлены два новых антигенных детерминанта: остатки 25-55 и 72-89 [7]. Из вышеизложенного видно, что участок миоглобина человека с аминокислотными остатками I39-I42 входит в состав нового, ранее не описанного эпитопа миоглобина.

Изучена и локализация эпитопа для антител 3C1.2. Результаты иммуноблоттинга показали, что МКА 3C1.2 связываются с фрагментами миоглобина 32-I39 и 56-I3I (см. рис. I и 2). Следовательно, эпитоп находится на фрагменте 56-I3I. Для дальнейшей локализации этого эпитопа использовали данные видовой специфики МКА 3C1.2 (табл. 2). Оказалось, что эти антитела

Таблица 2

Оптические плотности прямого иммуоферментного анализа при связывании МКА 3C1.2 с миоглобинами разных видов

Клон	Миоглобины			
	человек	лошадь	собака	кашалот
3C1.2	> I,6	> I,6	> I,6	0,384

связываются с миоглобином человека, лошади и собаки, но практически не связываются с миоглобином кашалота. При изучении аминокислотного состава фрагмента 56-I3I в миоглобине человека, лошади, собаки, кашалота и мыши вызывает интерес фрагмент 74-83, который входит в состав одного из ранее описанных антигенных детерминантов [7]. Этот участок белка совершенно одинаков у человека, лошади и собаки, но в молекуле миоглоби-

на кашалота в позиции 74 вместо глицина находится аланин (см. табл. 3).

Таблица 3

Аминокислотный состав фрагмента миоглобина 74-83 у человека, лошади, собаки, кашалота и мыши (по Romero-Herrera et al., 1978; Harris et al., 1985)

Вид	Аминокислоты									
	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
человек	Gly	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly	His	His	Glu
лошадь	Gly	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly	His	His	Glu
собака	Gly	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly	His	His	Glu
кашалот	Ala	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly	His	His	Glu
мышь	Thr	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly	Gln	His	Ala

Этим различием можно объяснить связывание МКА 3C1.2 с миоглобинами человека, лошади и собаки, но не с миоглобином кашалота. Ранее показано, что при замене в эпитопе лишь одного аминокислотного остатка на другой антитела утрачивают способность связываться с этим эпитопом [2]. Далее, между данными участками миоглобина человека и мыши имеются различия в трех позициях: 74, 81 и 83 (см. табл. 3). Из литературных данных известно, что антитела вырабатываются в основном против участков миоглобина, отличающихся по аминокислотному составу от миоглобина хозяина [3, II]. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что МКА 3C1.2 связываются с миоглобином человека в регионе 74-83.

Получение МКА, связывающихся с секвенциальными эпитопами миоглобина человека, представляет большой интерес. В литературе отсутствуют данные об одновременном получении антител против секвенциальных и топографических эпитопов. Также отсутствуют данные о секвенциальных эпитопах миоглобина человека. Кроме того, в литературе нет данных и о получении МКА против секвенциальных эпитопов в случае использования в качестве антигена нативного миоглобина, но имеются данные о получении МКА в случае использования в качестве антигена синтетических пеп-

тидов [12,15]. Можно предположить, что лимфоциты, способные секретировать антитела как против секвенциальных, так и топографических эпитопов, возникли в нашем опыте в результате длительной иммунизации мышей, в ходе которой на формирование иммунного ответа смогли воздействовать и продукты катаболизма миоглобина в организме мыши.[10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Atassi M.Z. // Immunochem. Prot. - 1977. - V. 2. - P. 1.
2. Berzofsky J.A., Buckenmeyer G.K., Hicks G. et al. // J. Biol. Chem. - 1982. - V. 257. - P. 3189-3198.
3. Cooper H.M., East I.J., Todd P.E.E., Leach S.J. // Mol. Immunol. - 1984. - V. 21. - P. 479-487.
4. Crumpton M.J., Wilkinson J.M. // Biochem. J. - 1965. - V. 94. - P. 545-556.
5. Fling S.P., Gregerson D.S. // Anal. Biochem. - 1986. - V. 155. - P. 83-88.
6. Harper D.J., Liv K.-M., Kangro H.O. // Anal. Biochem. - 1986. - V. 155. - P. 270-274.
7. Leach S.J. // Biopolymers. - 1983. - V. 22. - P. 425-440.
8. Marshall R.C., Jones W.C., Vigna R.A., Gurd F.R.N. // Z. Naturforsch. - 1974. - Bd. 29C. - S. 90-91.
9. Rodda S.J., Geysen H.M., Mason T.J., Shoofs P.G. // Mol. Immunol. - 1986. - V. 23. - P. 603-610.
10. Juronen E.I., Viikmaa M.H., Mikelsaar A.-V.N. // J. Immunol. Meth. - 1988. - V. 111. - P. 109-115.
11. Romero-Herrera A.E., Lehman H., Joysey K.A., Friday A.E. // Philos. Trans. Rev. Soc. Lond. (Biol.) - 1978. - V. 283. - P. 61-163.
12. Schmitz H., Atassi H., Atassi Z. // Mol. Immunol. - 1983. - V. 20. - P. 719-726.
13. Singhal R.P., Atassi M.Z. // Biochemistry. - 1971. - V. 10. - P. 1756-1762.
14. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1979. - V. 76. - P. 4350-4354.
15. Young C.R., Schmitz H.E., Atassi M.Z. // Mol. Immunol. - 1983. - V. 20. - P. 567-570.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ

М.Н.Чернова, С.Ф.Мирзоева, С.М.Драницына, Е.А.Сурина,
В.М.Липкин

Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина
АН СССР, Москва

Аденилатциклазная система является одной из главных и наиболее хорошо изученных точек приложения гормональных сигналов. Она представляет собой ферментативный комплекс, осуществляющий синтез циклического аденозинмонофосфата в ответ на связывание гормона с клеткой-мишенью. Она состоит из трех функционально различных компонентов - рецептора, ГТФ-связывающего регуляторного белка и собственно каталитического С-белка. Наименее охарактеризованным компонентом аденилатциклазной системы является каталитическая субъединица, из-за ее нестабильности и ничтожного содержания в тканях, на ее долю приходится менее пяти тысячных процента от суммарного мембранного белка.

В последние годы в ряде лабораторий мира разработаны подходы к получению С-белка в индивидуальном состоянии, но все существующие в настоящее время методики очистки позволяют получить фермент лишь в аналитических количествах.

Нами разработана схема препаративного выделения кальмодулин-независимой формы аденилатциклазы из коры головного мозга быка. Практически гомогенный препарат этого белка был выделен с помощью аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованными моноклональными антителами. Для получения моноклональных антител проводили иммунизацию мышей линии BALB/c препаратом, содержащим менее 1 % аденилатциклазы. Его получали путем ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-Сефацелле солюбилизованных *Chaps*-ом мембранных белков [5]. Удельная активность препарата была 40 нМ/мкг·мин, что соответствовало 80-кратной очистке по сравнению с исходными мембранами.

Моноклональные антитела получали по методу [4], используя для иммунизации мышей линии BALB/c. Иммунизация проводилась путем четырехкратного внутрибрюшинного введения с двухнедель-

ным интервалом по 100 мкг антигена. Клетки иммунной селезенки сливали с клетками миеломной линии X-63Ag8653. В результате было отобрано 40 положительных клонов. Моноклональные антитела, секретируемые этими гибридами, далее тестировались, во-первых, по способности ингибировать аденилатциклазную активность, что позволило оставить лишь 4 моноклональных антитела, и, во-вторых, по способности иммунопреципитировать фермент. В итоге было отобрано 2 моноклональных антитела, которые, будучи иммобилизованными на белок А-сефарозе, сорбировали аденилатциклазу. Об этом свидетельствует убывь циклазной активности в надосадочном растворе после инкубации препарата аденилатциклазы с иммобилизованными моноклональными антителами. Аденилатциклазную активность определяли по методу [11] с использованием $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$. Эти два моноклональных антитела и были использованы для приготовления аффинных сорбентов. Из асцитной жидкости антитела выделялись с помощью фракционирования сульфатом аммония с последующей аффинной хроматографией на белок А-сефарозе [2]. Иммобилизацию антител на BrCN-сефарозу проводили по методу [8].

Препарат солюбилизированных Лубролом мембранных белков инкубировали в течение 14 часов с иммуносорбентом. Затем сорбент переносили в колонку и промывали буферным раствором высокой ионной силы с 1 % Лубролом для удаления неспецифически сорбированных белков. Специфическая элюция осуществлялась 3 М роданидом аммония. Электрофоретический анализ показал, что одно из антител сорбирует на себе антиген с молекулярной массой около 42 кД, являющийся, по-видимому, α -субъединицей стимулирующего G-белка. Наибольшее внимания заслуживало другое моноклональное антитело (B_3C_3) т.к. в препарате, полученном в результате аффинной хроматографии на иммуносорбенте с этим антителом в качестве лиганда, присутствовал преимущественно один белок с молекулярной массой 140 кД (рис. 1), что по литературным данным соответствует молекулярной массе каталитического компонента аденилатциклазы [3,10,7]. Из электрофореграммы этого препарата видно, что он также содержит 10 %-ную примесь полипептида с молекулярной массой 180 кД. Иммуноблоттинг с моноклональным антителом B_3C_3 показал, что оба поли-

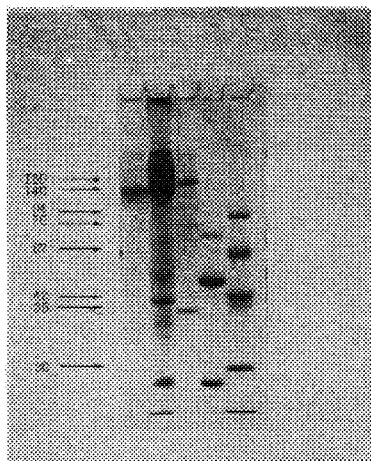


Рис. 1. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (нумерация дорожек справа налево).

1 - белковые стандарты; 2 - моноклональные антитела B_3C_3 ; 3 - РНК-полимераза; 4 - препарат кальмодулин-независимой аденилатциклазы (140 кД) после хроматографии на колонке с иммобилизованными моноклональными антителами B_3C_3 ; 5 - то же, что 4, с последующей электроэлюцией полосы 140 кД из акриламидного геля.

пептида дают перекрестную иммунологическую реакцию. С помощью двойной иммунодиффузии по Ухтерлони [6] был определен вид моноклональных антител: $\gamma_1 k$.

Необходимо было доказать, что данный белок действительно является каталитической субъединицей, т.е. обладает аденилатциклазной активностью. К сожалению, известные на сегодняшний день методы элюции антигена с иммуносорбента - низкое, или высокое значение pH, высокие концентрации хаотропных агентов - являются слишком жесткими, поэтому необратимо инактивируют аденилатциклазу.

Для получения препарата активной аденилатциклазы были использованы два подхода. Во-первых, комплекс антиген-антитело разрушали путем восстановления дисульфидных связей между тяжелой и легкой цепями иммуноглобулина. Иммуносорбент в комплексе с ферментом инкубировали с 200 мМ меркаптоэтанолом. Через три часа наблюдалось 16-кратное увеличение циклазной активности супернатанта по сравнению с контролем (рис. 2). Во-вторых, на полипептид 140 кД, электроэлюированный из полиакриламидного геля, была получена поликлональная сыворотка, ко-

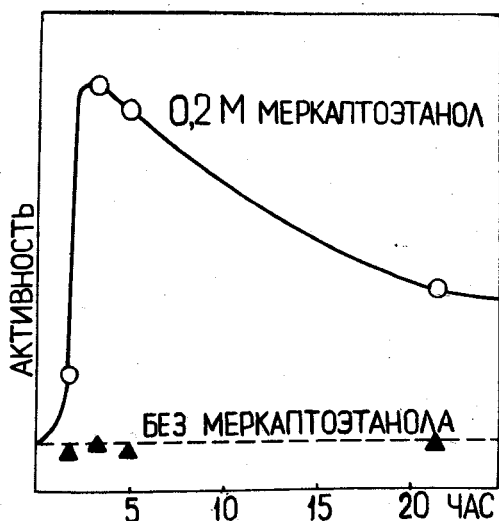


Рис. 2. Изменение ферментативной активности аденилатциклазы в комплексе с антителом после обработки меркаптоэтанолом.

торая очищалась аффинной хроматографией на нерастворимом конъюгате — бычьего сывороточного альбумина и полипептида 140 кД. Полученные поликлональные антитела эффективно ингибировали аденилатциклазную активность, а после иммобилизации на белок А-сефарозе обладали свойством связывать фермент из раствора (рис. 3).

Таким образом, удалось выделить практически в один этап кальмодулин-независимую форму аденилатциклазы. Этот способ позволяет получать фермент в препаративных количествах, и в настоящее время начата работа по изучению его первичной структуры.

На препарат аденилатциклазы, выделенный элюцией с иммуносорбента, иммунизацией *in vivo* и *in vitro* был получен ряд моноклональных антител. Иммунизация *in vitro* была выполнена по методу [12] с небольшими модификациями. Для увеличения продуктивности гибридом в среду для иммунизации добавлялись, кроме стандартных добавок, такие иммуностимуляторы, как мурамилдипептид (МДП) (10 мкг/мл) и декстран сульфат (40 мкг/мл) [9]. В результате к данному препарату белка было получено 2 моноклональных антитела с изотипом IgM, которые нуждаются в

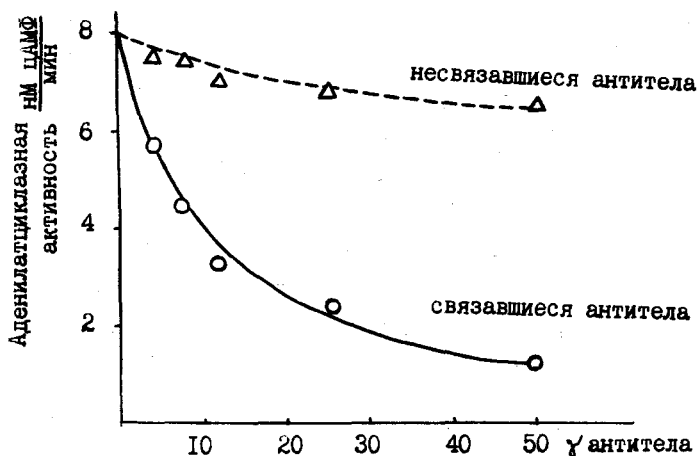


Рис. 3. Влияние антител к полипептиду 140 кД на аденилатциклазную активность.

дальнейшей характеристики и применении их для структурно-функционального изучения аденилатциклазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Engvall E., Perlmann P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1972. - V. 77. - P. 6841.
2. Hjelm H., Hjelm K., Sjöquist J. // FEBS Lett. - 1972. - V. 28. - P. 73-76.
3. Jeager R.E., Heideman W., Rosenberg G.B., Storm D.R. // Biochemistry. - 1985. - V. 24. - P. 3776-3783.
4. Köhler G., Milstein C. // Nature. - 1975. - V. 256. - P. 498-501.
5. Липкин В.М., Мирзоева С.Ф., Драницына С.М., Мошняков М.В., Петров В.М., Чернова М.Н., Сурина Е.А., Обухов А.Н., Левина Н.Б., Храпцов Н.В., Андреева С.Г., Ракитина Т.В., Фещенко Е.А., Овчинников Ю.А. // Биоорг. химия, в печати.
6. Ouchterlony Ö. // Ark. Kemi. - 1950. - V. 1. - P. 43-50.
7. Pfeuffer E., Dreker R.-M., Metzger H., Pfeuffer T. //

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1985. - V. 82. - P. 3086-3090.
8. "Practical Immunology" / Second edition, Oxford, London. - P. 156-169.
 9. Schelling M. // Hybridoma. - 1986. - V. 5. - No. 2. - P. 156-161.
 10. Smigel M.D. // J. Biol. Chem. - 1986. - V. 261. - P.1976-1982.
 11. Solomon Y., Londos G., Rodbell M. // Anal. Biochem. - 1974. - V. 58. - P. 541-548.
 12. Van Ness J., Laemmli V.K., Pettijohn D.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1984. - V. 81. - P. 7897-7901.

БЕЛОК ИЗ МОЗГА БЫКА, ПРОЯВЛЯЮЩИЙ АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА
 α -ЛАТРОТОКСИНА

О.М.Цыганкова, Л.А.Третьяков, Е.В.Гришин

Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина АН
СССР, Москва

Для исследования ряда рецепторных систем широко используются природные нейротоксины, мишенью действия которых являются функционально важные мембранные белки. В последнее время для некоторых нейротоксинов (апамин, тетродотоксин [2,5]) в нервной ткани были идентифицированы эндогенные аналоги - лиганды соответствующих рецепторов. Также, с помощью иммунохимических методов были обнаружены эндогенные лиганды опиатных рецепторов и рецепторов бензодиазепинов [10,11]. Функциональная роль подобных эндогенных факторов остается пока неизвестной, но не исключено, что они могут участвовать в регуляции функционирования мембранных рецепторных систем.

Среди природных нейротоксинов, влияющих на секрецию медиатора, особый интерес представляет α -латротоксин - основной токсический компонент яда паука *Latrodectus mactaus tredecimguttatus* [6]. Данная работа посвящена идентификации и изучению нейронального белка, обладающего антигенными свойствами латротоксина.

Для обнаружения нейронального компонента с антигенными свойствами латротоксина использовали кроличьи моноспецифические антитела против токсина, выделенные из сыворотки иммунных кроликов с помощью аффинной хроматографии (рис. I).

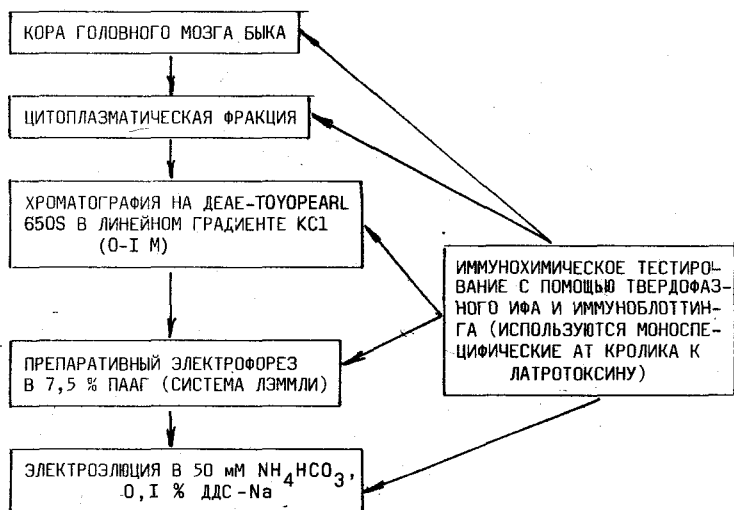


Рис. I. Схема выделения нейронального белка с антигенными свойствами латротоксина.

В качестве объекта исследования была выбрана кора головного мозга быка. С помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА) изучали взаимодействие кроличьих антител с различными фракциями коры. При этом, максимальный уровень связывания удалось обнаружить в цитоплазматической фракции. Специфичность связывания в ИФА подтверждалась в контрольных опытах с использованием нормальных кроличьих антител. С целью очистки активного компонента цитоплазматическую фракцию разделяли с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-Toyopearl 650S (Toyo Soda, Япония) в градиенте концентрации KCl. Фракции, элюируемые в диапазоне 0,3-0,4 М KCl, максимально связывались с

антителами к латротоксину. В дальнейшем идентификация осуществлялась посредством электрофореза по Лэммли [4] с последующим электрофоретическим переносом белков на нитроцеллюлозный фильтр [9]. После обработки раствором овальбумина фильтр последовательно инкубировали с моноспецифическими антителами против латротоксина (в контроле – с нормальными иммуноглобулинами кролика), с конъюгатом вторичных козлиных антител и пероксидазы, а затем обрабатывали субстратом. Моноспецифические антитела взаимодействовали с белковым компонентом с молекулярной массой около 100 кД (рис. 2). Соотнесение белковых зон, проявляющихся при иммуноблоттинге и при окраске геля Ку-масси R-250, обеспечивалось с помощью обработки нитроцеллюлозного фильтра флуоресцентным красителем [8].

Данные электрофореза и иммуноблоттинга не позволяли с большой точностью судить о количестве белковых компонентов, проявляющих антигенные свойства латротоксина. Поэтому для более полного изучения искомого компонента (компонентов) представлялось весьма перспективным использование моноклональных антител. Для этой цели активный материал выделяли электрофоретическим способом: фракцию, полученную при ионообменной хроматографии (0,3-0,4 М KCl), разделяли с помощью препаративного электрофореза. После окрашивания необходимую зону вырезали и элюировали из нее белковые компоненты по методу [7], которые использовали в качестве антигена для получения моноклональных антител и их тестирования с помощью ИФА.

Мышей линии BALB/c иммунизировали элюированным материалом, растворенным в 0,15 М NaCl, 10 мМ фосфата натрия, pH 7,4 и суспендированным в адъюванте Фрейнда. На пятый день после буст-иммунизации мышь забивали и брали асептически селезенку. Слияние спленоцитов проводили с миеломной Sp2/0-Ag14 с помощью полиэтиленгликоля 1500 [3]. Супернатанты полученных гибридом тестировали, и активные клоны клонировали методом лимитирующих разведений. Было получено около 30 активных гибридомных линий, из которых 12 были отобраны для дальнейшего тестирования. Моноклональные антитела выделяли из клеточных супернатантов с помощью высаливания 50 %-ным $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ с последующей хроматографией на сефарозе 4В, конъюгированной с кроличьими антителами против мышинных иммуноглобулинов. Из 12 тестирован-

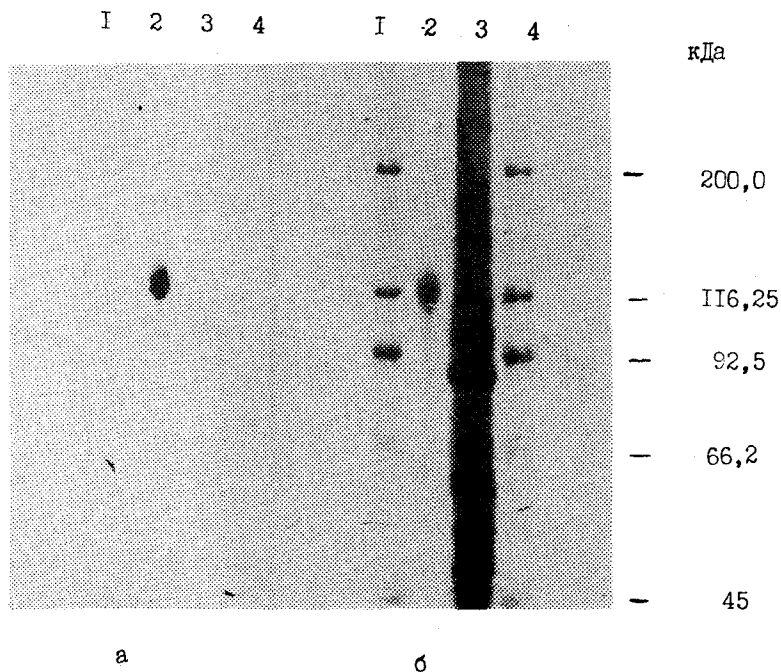


Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа фракции, полученной при элюции 0,3-0,4 М КС1 с ДЕАЕ-Toyopearl 650S: а - иммунохимическая детекция нейронального белка с антигенными свойствами латротоксина на нитроцеллюлозном фильтре после электрофоретического переноса с геля; б - электрофореграмма с окраской Ку-масси R-250.

I,4 - стандартные белки; 2 - латротоксин; 3 - фракция, элюируемая 0,3-0,4 М КС1.

ных моноклональных антител 2 принадлежали классу IgM, остальные - IgG1 или IgG2b. Очищенные антитела проверяли на связывание с исходной фракцией (0,3-0,4 М КС1), элюированным белком и латротоксином с помощью ИФА и иммуноблоттинга (табл. I).

Таблица I

Анти- тела	Объект связывания		
	элюированные белки	латро- токсин	фракция 0,3-0,4 М КС1
2A/5G	+(ИФА)	-	+(ИФА, иммуноблот.)
1A/5C	+(ИФА)	-	-
1A/6C	+(ИФА)	+(ИФА)	+(ИФА, иммуноблот.)
1C/С7	+(ИФА)	-	+(ИФА, иммуноблот.)
4E/4C	+(ИФА)	-	-
8Д	+(ИФА)	-	-
4F	+(ИФА)	-	-
5Д/Д4	+(ИФА)	-	+(ИФА)
8В/ВЕ	+(ИФА)	-	-
2А/6А	+(ИФА)	-	-
1С/В4	+(ИФА)	+(ИФА)	-
4С/Н5	+(ИФА)	-	-

Только 2 моноклональные антитела связывались с латротоксином в ИФА, и 4 - с фракцией белков, полученной при элюции 0,3-0,4 М КС1 с ионообменной колонки. 3 антитела, которые тестировали с помощью иммуноблоттинга, узнавали активные компоненты с молекулярной массой около 100 кД.

Следующим этапом настоящей работы будет являться создание иммунного сорбента на основе моноклональных антител для выделения и дальнейшего изучения искоемых компонентов. Также является перспективным использование полученных моноклональных антител для скрининга клонотекки структурных генов из мозга быка.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Blas A.L., Park D., Friedrich P. // Brain Res. - 1987. - V. 413. - P. 275-284.
2. Fosset M., Schmid-Antomarchi H., Romey M., Lazdunski M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1984. - V. 81. - P. 7228-7232.

3. Gafre G., Howe S.C., Mistein C., Butcher G.W., Howard J.C. // Nature (London). - 1977. - V. 266. - P. 550-556.
4. Laemmli U.K. // Nature (London). - 1970. - V. 227. - P. 680-685.
5. Lombet A., Fosset M., Romey M., Jacomet Y., Lazdunski M. // Brain Res. - 1987. - V. 417. - P. 327-334.
6. Meldonesi J., Scheer H., Maddeddu L., Wanke E. // Trends Pharmacol. Sci. - 1986. - V. 47. - P. 154-155.
7. Stcarne P.A., van Driel I.R., Grego B., Simpson R.J., Goding J.W. // J. Immunol. - 1986. - V. 134. - P.443-448.
8. Szewzuk B., Summers D.F. // Anal. Biochem. - 1987. - V. 164. - P. 303-306.
9. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1979. - V. 76. - P. 4350-4354.
10. Weitz C.J., Lowney L.I., Faull K.F., Feistuer G., Goldstein A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1986. - V. 83. - P. 9784-9788.

ГИБРИДОМЫ И МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА II

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОФЛУОРИМЕТРИИ ВРЕМЕННОГО РАЗРЕШЕНИЯ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСОВ

М.Ю.Саарма, Л.В.Ярвекюльг, Л.В.Андреева, М.М.Оямаа,
Р.К.Синиярв

Институт химической и биологической физики АН ЭССР,
г. Таллинн

Для исследования и определения вирусов разработан целый ряд чувствительных иммунохимических методов: преципитация, иммунодиффузия, гемагглютинация, латекс-агглютинация, иммуно-электронная микроскопия, радиоиммуноанализ (РИА) и иммуноферментный анализ (ИФА). Среди них наиболее широкое применение нашли РИА и ИФА. Преимущество методов РИА и ИФА заключается в достаточно высокой чувствительности анализа, воспроизводимости результатов, скорости и удобстве проведения большого количества анализов.

Сделано много попыток разработать более совершенные неизо-топные методы иммуноанализа, в основном, путем нахождения новых способов количественного определения продуктов иммунореакции. Хотя измерение флуоресценции само по себе является очень чувствительным аналитическим методом, флуороиммуноанализ не нашел широкого распространения [1]. На практике чувствительность флуороиммуноанализа оказалась недостаточно высокой из-за относительно большой фоновой флуоресценции биологических образцов, обусловленной содержащимися флуорохромами и рассеянием света. Однако, недавно был предложен новый способ флуороиммуноанализа, в основу которого положено измерение флуоресценции хелатных комплексов лантанидов с применением флуориметрии временного разрешения [2,3]. Оказалось, что некоторые лантаниды, например европий и тербий, а также самарий и диспрозий образуют сильно флуоресцирующие хелаты с многими органическими лигандами. При возбуждении такого комплекса энергия возбуждения поглощается лигандом и затем переносится

на ион металла хелата. Флуоресценция этих лантанидов имеет широкую полосу возбуждения и узкую полосу испускания. Максимумы указанных полос сильно смещены относительно друг друга, т.е. возбужденный комплекс характеризуется сильным сдвигом Стокса и длинным временем тушения флуоресценции (0,1-1 мс) [3]. Флуориметрия временного разрешения позволяет существенно понизить фоновую короткоживущую флуоресценцию изучаемых биологических объектов, поскольку возбуждение образца световыми импульсами и детектирование флуоресценции разделены во времени (рис. 1). Разработана специальная аппаратура [4] и метки хелата европия [2], позволяющие измерить концентрацию европия меньше, чем 5×10^{-14} М. На основе этого разработан метод временно-разрешенного флуороиммуноанализа (ВРФИА), где используются антитела, меченные флуоресцентным хелатом европия [2,5]. По чувствительности ВРФИА равен или превышает РИА, во всяком случае при определении вирусов человека [1,5-7], а также и при определении вирусов растений [8-11]. Иммунологическая

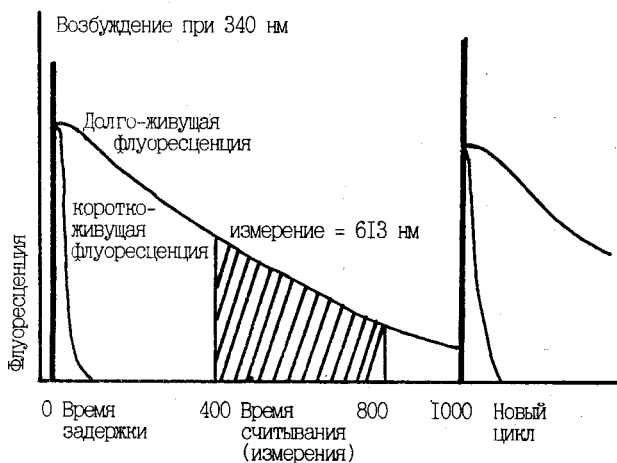


Рис. 1. Схематическое изображение принципов измерения флуориметрии временного разрешения [3].

часть ВРФИА проводится аналогично ИФА, разница лишь в последнем этапе, где вместо субстрата добавляется т.н. "усиливающий раствор". Для конъюгирования антител (Ат) с ионами европия используют дериваты поликарбоновых кислот, например, диазофенил-ЭДТА-Еу и изотиоцианатофенил-ЭДТА-Еу, которые образуют с Ат стабильные хелатные комплексы. Перед измерением флуоресценции в кювету анализа добавляют "усиливающий раствор", который способствует диссоциации комплекса хелата с Ат и освобождению Eu^{3+} катионов в раствор, где они образуют новый интенсивно флуоресцирующий хелатный комплекс с компонентами "усиливающего раствора" (Тритон X-100, β -дикетон и основание Льюиса). Весь цикл измерения флуоресценции образца занимает 1 с. Теоретический расчет, а также экспериментальные данные показывают, что чувствительность ВРФИА метода не уступает РИА [II], в то же время исключает сложности, возникающие при работе с радиоизотопами. Однако реальная чувствительность ВРФИА метода определяется, прежде всего, сигналом контрольных образцов, т.е., применение ВРФИА метода в каждом отдельном случае требует специального исследования.

Недавно опубликован обширный обзор об использовании ВРФИА в различных областях биотехнологии и медицины [7]. В последнее время в нашей лаборатории разработан ВРФИА для определения некоторых вирусов картофеля с использованием как очищенных вирусных препаратов, так и листьев, клубней и проростков картофеля [8-III]. В этих работах применяли двухступенчатый и одноступенчатый "сэндвич" вариант ВРФИА с мечеными моноклональными антителами (МАт) [9-III] и поликлональными антителами (ПАт) [8]. Было показано, что чувствительность ВРФИА в двухступенчатой постановке иммуноанализа значительно превышает ИФА и достигает 0,1-1 нг/мл. При определении X вируса картофеля (ХВК) с использованием очищенных препаратов вируса в одноступенчатой постановке ВРФИА чувствительность определения ХВК достигала 5 пг/мл [III]. В одноступенчатой постановке ВРФИА на предварительно сенсibilизированные МАт и ПАт полистирольные платы одновременно добавляют образец исследуемого антигена и конъюгата (меченные лантанидом антитела), инкубируют пробы 1,5 часа при 37° С, затем через 10 минут после добавления "усиливающего раствора" измеряют флуоресценцию хелата ланта-

нида.

Наши результаты показывают, что одноступенчатая постановка ВРФИА по чувствительности не уступает двухступенчатой и ввиду скорости анализа перспективна для проведения экспресс-тестов фитовирусов. Следует, однако, отметить, что при очень высоких концентрациях вируса в анализируемых пробах при использовании одноступенчатой постановки ВРФИА наблюдается Гук эффект, в результате чего определяемая в образце концентрация вируса будет несколько занижена [6,11].

Расположение узких полос максимумов флуоресценции хелатов европия (Eu^{3+}), самария (Sm^{3+}), тербия (Tb^{3+}) и диспрозия (Dy^{3+}) на разных длинах волн и существенные различия во времени жизни флуоресценции перечисленных лантанидов открывают возможности одновременного определения двух, трех и четырех антигенов (вирусов) (рис. 2). Это обстоятельство дает ВРФИА в дополнение к высокой чувствительности еще и принципиальное преимущество по сравнению с другими иммунологическими методами.

Определение нескольких вирусов в одной пробе является ежедневной проблемой в медицине, ветеринарии, фитовирусологии и т.д. Так, например, при анализе донорской крови необходимо выявить инфекцию вирусом гепатита В и СПИД. При диагностике вирусных заболеваний дыхательных путей необходимо провести исследование на наличие 6-7 вирусов.

Очень актуальной является проблема смешанной инфекции в картофелеводстве, где растения картофеля довольно часто заражены двумя, тремя или даже четырьмя вирусами [12]. При рутинном зимнем анализе клубней, который проводится во всех развитых странах, это означает, что все клубни тестируют на наличие шести вирусов картофеля (X, Y, A, S, M и ВСКЛ), проводя шесть независимых ИФА-тестов [13]. Применение двойного мечения позволило бы сократить количество анализов вдвое, а применение тройного мечения - втрое. Кроме того, на практике довольно часто встречаются случаи, когда двойная инфекция растений картофеля причинена родственными вирусами. Различить эти вирусы друг от друга, используя стандартные ПАТ и классические методы иммуноанализа, затруднительно.

В последнее время развитие ВРФИА привело к использованию

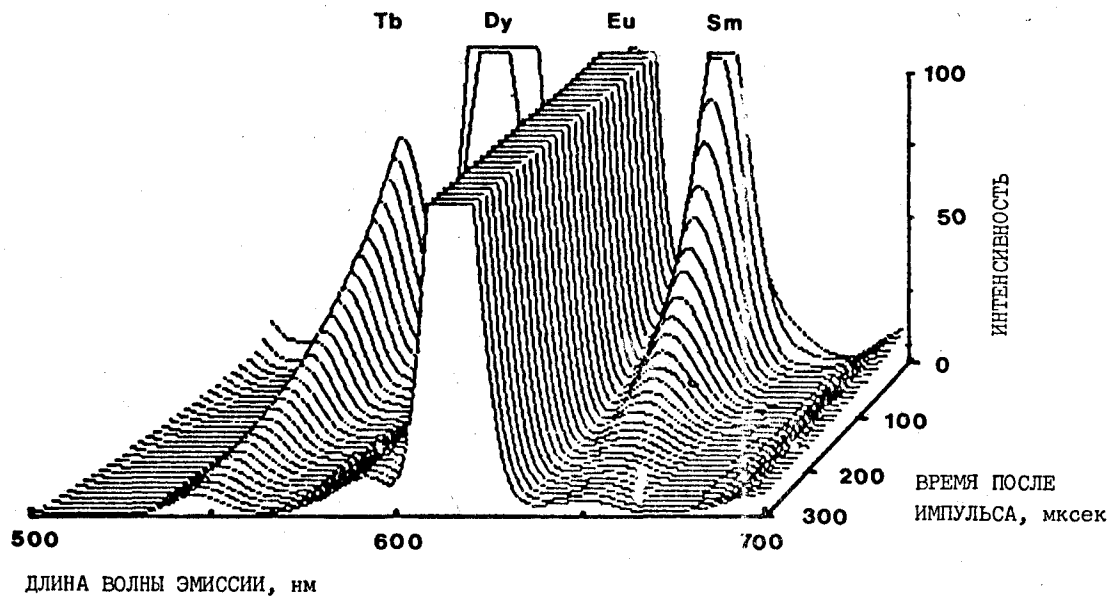


Рис. 2. Трехмерное изображение флуоресцентных спектров хелатов тербия (Tb), диспрозия (Dy), европия (Eu) и самария (Sm).

двойной метки Eu-Tb [14] или Eu-Sm [15,16], что позволяет одновременно определить два различных антигена (гормона, вируса и др.) в одной пробе.

На рис. 3 приведены данные одновременного количественного определения двух вирусов - ХВК и М вируса картофеля (МВК) при помощи ВРФИА с двойной меткой. В случае двойного мечения иммуносорбентом была смесь антител к ХВК и МВК, а в качестве конъю-

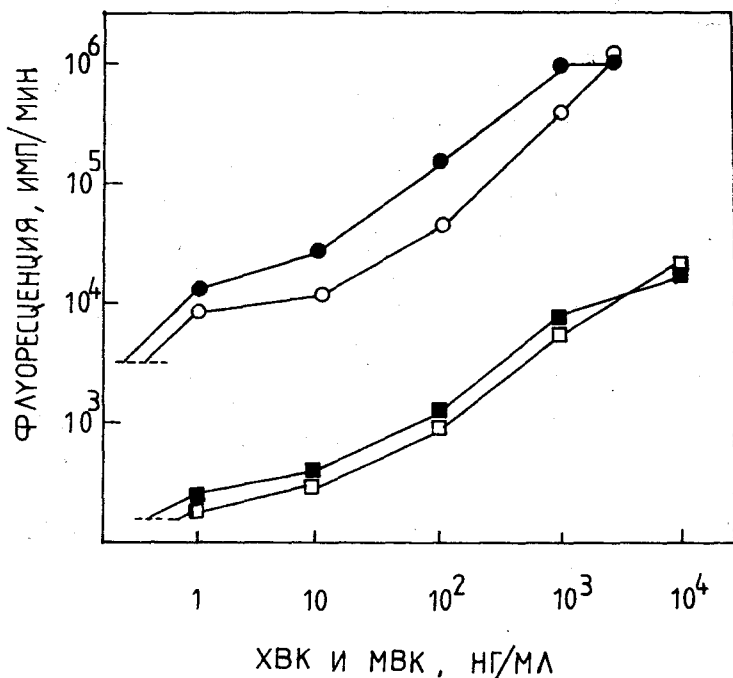


Рис. 3. Одновременное определение ХВК и МВК ВРФИА двойного мечения. Иммуносорбент: смесь 21хD2/М4Ц1.

(○) - Eu^{3+} -М6D5 конъюгат; (●, ■) - смесь Eu^{3+} -
-М6D5/ Sm^{3+} 21хD2; (□) - Sm^{3+} 21хD2 конъюгат. Эмиссия
при 613 нм (○, ●) и 643 нм (□, ■).

югата используют смесь МАТ к ХВК и МВК, меченных хелатами самария и европия, соответственно. Результаты двойного флуориммуноанализа, приведенные на рис. 3, показывают, что пределы одновременного определения двух вирусов были 1 нг/мл ХВК и 1 нг/мл МВК. Следовательно, чувствительность двойного ВРФИА в 10 раз превышает чувствительность определения этих вирусов при помощи ИФА. В случае ИФА в одном анализе можно определить только лишь один вирус. При одновременном количественном определении трех вирусов методом ВРФИА в качестве иммуносорбента используют смесь антител к трем вирусам, а конъюгатом служит смесь антител, меченных хелатами европия, самария и тербия. Чувствительность одновременного определения трех вирусов - МВК, ХВК и вируса скручивания листьев картофеля (ВСКЛ) составляет 5 нг/мл, 5 нг/мл и 100 нг/мл, соответственно (табл. I). Определение ХВК с самарий меченными антителами при 643 нм и определение ХВК с европий меченными антителами при 613 нм в условиях тройного мечения по чувствительности равно ИФА и не уступает чувствительности ВРФИА двойного мечения. Чувствительность же определения ВСКЛ с тербий меченными антителами существенно ниже даже чувствительности ИФА. Это связано прежде всего с флуоресцентными свойствами хелатов тербия и измерением их флуоресценции на существующем флуориметре [14]. В итоге, ВРФИА в двойным и тройным мечением Eu^{3+} , Sm^{3+} и Tb^{3+} -меченными антителами позволяет в одном анализе провести количественное определение двух или трех вирусов. Это обстоятельство открывает принципиально новые возможности при диагностике вирусных антигенов, в том числе в массовой практической фитовирусологии.

Авторы выражают благодарность А.Капста за оформление рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hemmilä I. // Clin. Chem. - 1985. - V. 31. - P. 359-370.
2. Hemmilä I., Dakubu S., Makkala V.-M. et al. // Anal. Biochem. - 1984. - V. 137. - P. 335-343.
3. Soini E. // In: Monoclonal Antibodies and New Trends in Immunoassays / Ed. by Ch.A.Bizzillon. Amsterdam: Elsevier,

Таблица I

Одновременное определение трех вирусов картофеля ВРФИА методом

Вирусы	МВК	ХВК	ВСЛК
Иммуносорбент	Смесь МАТ М6D5, 21хD2 и L6D5		
Конъюгаты	смесь Eu-M6D5*	Sm-21хD2	Tb-L6D5
Длина волны измерения, нм	613	643	545
Концентрация вируса нг/мл каждого			
0,05	7588	162	1364
0,1	7657	192	1432
0,5	7509	186	1355
1,0	7441	221	1480
5,0	16580	278	1456
10	27590	341	1426
50	54060	668	1507
100	91600	1340	1731
500	257000	3627	3968
Контроль:	5480	154	1394

*Результаты приведены в импульсах/сек как среднее двух измерений.

1984. - P. 197-207.
4. Soini E., Kojola H. // Clin. Chem. - 1983. - V. 29. - P. 65-68.
 5. Siitari H., Hemmilä I., Soini E. et al. // Nature. - 1983. - V. 301. - P. 258-260.
 6. Halonen P., Bonfanti C., Lövgren T. et al. // In: Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology/ Heidelberg, Springer Verlag, 1985. - P. 429-437.
 7. Soini E., Lövgren T. // In: CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry, 1987. - V. 18. - No. 2. - P. 105-154.
 8. Siitari H., Kurppa A. // J. Gen. Virol. - 1987. - V. 68. - P. 1423-1428.
 9. Ярвекюльг Л.В., Сыбер Ю.П., Синиярв Р.К. и др. // Доклады ВАСХНИЛ. - 1987. - № 12. - С. 15-18.
 10. Järvekülg L., Söber J., Sinijärv R. et al. // Annals Appl. Biol. - 1988. - V. 114. - P. 341-353.
 11. Sinijärv R., Järvekülg L., Andreeva E. et al. // J. Gen. Virol. - 1988. - V. 69. - P. 991-998.
 12. Rich A.E. // Potato Diseases / Academic Press Inc., 1983. - P. 92-135.
 13. Van Regenmortel M.H.V. // In: Developments in Applied Biology. - 1986. - No. 1. - P. 89-101.
 14. Hemmilä I., Holttinen S., Petterson K. et al. // Clin. Chem. - 1987. - V. 33. - P. 2281-2283.
 15. Синиярв Р.К., Ярвекюльг Л.В., Саарма М.Ю. // Доклады ВАСХНИЛ. - 1988. - № 8. - С. 16-18.
 16. Saarma M., Järvekülg L., Hemmilä I. et al. // J. Virol. Meth. - 1988. - V. 17. (в печати).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛИПЕПТИДА, СОДЕРЖАЩЕГО
АНТИГЕННЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ БЕЛКА р24 ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА
ЧЕЛОВЕКА (ВИЧ), В ДИАГНОСТИКЕ СПИД

У.В.Барсов, А.Н.Полторак, М.И.Букринский, В.А.Пасечник,
Г.Ф.Пучкова, Е.А.Полякова, И.А.Костарева

ВНИИ особо чистых биопрепаратов, Ленинград, Институт
вирусологии им. Ивановского АМН СССР, Москва

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является этиологическим агентом синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) [1] - заболевания, получившего широкое распространение в США, ряде стран Африки и на Европейском континенте. В настоящее время разработка методов специфической профилактики представляется чрезвычайно актуальной. В рамках этого направления борьбы с инфекцией одной из важнейших задач является конструирование надежных диагностических тест-систем для выявления антител к вирусным антигенам в сыворотках крови носителей ВИЧ и больных СПИД.

Необходимое условие для создания таких систем - наличие достаточных количеств очищенных вируссpezifических белков. Структура генома ВИЧ и многие свойства вирионных белков хорошо изучены [2]. Это делает методы генетической инженерии особенно привлекательными для получения полипептидов, несущих различные антигенные детерминанты вируса. Применение методов биотехнологии открывает также широкие возможности для последующей очистки рекомбинантных белков.

В настоящее время известно, что изменение уровней антител к различным антигенам ВИЧ в процессе развития заболевания имеет некоторые характерные особенности. Так, показано, что в крови носителей вируса и лиц, находящихся в инкубационном периоде, преобладающими (а иногда и единственными) являются антитела к внутренним белкам вириона, главную фракцию которых составляют антитела к основному внутреннему белку р24 - продукту экспрессии гена *gag* [3]. Сравнительно недавнее появление инфекции на территории СССР позволяет предположить, что основную массу вирусоносителей в нашей стране составляют лица, в крови которых с наибольшей вероятностью должны обнаруживаться антитела к антигенным детерминантам р24. Определение этих ан-

тител, очевидно, даст возможность выявлять начальные стадии заболевания, не имеющие клинических проявлений, и, тем самым, осуществлять раннюю серодиагностику СПИД. Поэтому мы поставили задачу получить штамм *E. coli*, синтезирующий значительные количества рекомбинантного белка р24, который можно было бы применять для конструирования тест-систем.

Использование в качестве диагностических реагентов неочищенных лизатов *E. coli*, содержащих вирусспецифические полипептиды, приводит, как правило, к частому получению ложноположительных результатов из-за присутствия в исследуемых сыворотках антител, реагирующих с белками *E. coli*. Еще одной задачей настоящей работы была разработка способов очистки рекомбинантного р24, делающих возможным его применение для диагностики.

Результаты и обсуждение

Для клонирования фрагмента гена *gag* мы применили вектор pUC18, в котором встроенная ДНК находилась под контролем *lac*-промотора. Возможность использования этой векторной системы для получения экспрессии генов ВИЧ показана ранее [4]. В ходе клонирования и культивирования использовался штамм JM107, имеющий мутантный ген-репрессор *lacI* в составе плазмиды и синтезирующий повышенное количество белка репрессора *lacI*. С другой стороны, применяли также катаболитную репрессию, выращивая клетки, несущие pRCp24, в присутствии глюкозы. Ранее установлено, что, несмотря на это, в такой системе происходит некоторая "утечка" мРНК [5], что указывает на неполную репрессию. Тем не менее, полученный штамм JM107/pRCp24 оказался стабильным с точки зрения устойчивости плазмиды и уровня синтеза рекомбинантного белка. Продукты экспрессии гена *gag* в отличие от белков *env* не содержат гидрофобных аминокислотных последовательностей и, следовательно, они менее токсичны для клеток *E. coli*.

Для клонирования нами был выбран фрагмент гена *gag* ВИЧ, содержащий последовательность, кодирующую р24, незначительный участок р17 и р9. Фрагмент встраивали таким образом, чтобы он находился в одной рамке считывания с АТГ-кодоном плазмиды с 5'-конца и терминирующим кодоном TAG в составе полилинкера pUC18 с 3'-конца.

Анализ рекомбинантных белков методом иммуноблоттинга показал, что клетки JM107/pRCp24 синтезируют полипептид с молекулярной массой 33 кД. Так как в клетках *E. coli* не наблюдается правильного протеолитического процессинга вирусспецифических белков, можно предполагать, что этот полипептид содержит полную аминокислотную последовательность р24 и р9. Присутствие антигенных детерминант р24 подтверждается результатами иммуноблоттинга с моноклональными антителами к р24, которые выявляют полосу, соответствующую по массе белку 33 кД.

Кроме полипептида 33 кД в лизатах индуцированных клеток выявляются несколько минорных белков с меньшей молекулярной массой, реагирующих с антителами больных СПИД. Эти полипептиды являются либо результатом инициации с внутренних сайтов АТГ гена gag, либо представляют собой продукты неправильного протеолитического расщепления белка 33 кД. В блоте детектируется также ряд слабоокрашенных полос, обусловленных наличием антител к *E. coli* в нормальной человеческой сыворотке.

Денситометрирование образцов клеточных лизатов показало, что уровень экспрессии через 10 часов индукции составляет 15% от общего количества клеточных белков. Основная часть антигенной активности переходит при ультразвуковой обработке клеток в супернатант, о чем свидетельствуют данные электрофореза и иммуноблоттинга тотального клеточного лизата, супернатанта после ультразвуковой обработки и содержащегося в клеточных стенках белка. Дальнейшее фракционирование лизата включало стадию удаления нуклеиновых кислот полиэтиленимидами и последующего осаждения белков сульфатом аммония. В интервале концентрации сульфата от 50 % до 80 % осаждается основная часть бактериальных белков, в том числе антиген. Поэтому солевое фракционирование является неэффективным методом очистки, так как не освобождает антиген от примесей, дающих перекрестные реакции с человеческой сывороткой. Следовательно, для более эффективного использования антигена в ИФА требуется его дополнительная очистка. С этой целью делали препаративный электрофорез антигена с его последующей элюцией из геля. Элюция включала в себя 2 стадии: обработку геля с антигеном в SDS-содержащем буфере и электродиализ через диализную мембрану с целью удаления детергента. Полученный препарат охарактери-

зовали на наличие примесных белков и на антигенную активность в иммуноблоттинге. Освобождение от примесей и, как следствие, от неспецифического окрашивания приводит к увеличению селективности антигена в ИФА. Очищенный препарат реагирует в разведении 1/64 с положительной сывороткой и не реагирует с сывороткой здорового человека.

Панель сывороток от 20 доноров, негативную в Вестерн-блоте с ВИЧ, проверяли на генно-инженерном антигене и получали для нее низкое значение оптической плотности, варьирующее от 0,02 до 0,2. В качестве положительного контроля антигена использовали 100 человеческих сывороток, положительных в диагностических системах "Вектор" (СССР), "Abbot" (США) и в вестерн-блоте на вирусе. 96 сывороток реагировали с генно-инженерным антигеном, 4 были определены как отрицательные. Далее, панель изучаемых сывороток была представлена 37 сыворотками людей из так называемой группы риска. Все они были отрицательны в вестерн-блоте, из них 6 реагировали с генно-инженерным антигеном. Из полученных данных следует, что рекомбинантный антиген является высокореактивным белком, который обнаруживает 96 % сывороток из тех, которые реагировали как положительные в других диагностических системах. Высокая чувствительность дополняется 100 % селективностью, исходя из анализа нормальных сывороток. Данные по 100 % селективности были подтверждены на большом числе нормальных сывороток в последующих опытах. Оценивая результаты проверки генно-инженерного диагностикума следует учитывать, что панель положительных сывороток содержала небольшое количество сывороток от пациентов с клиническим проявлением СПИД. Вместе с тем, из литературных данных известно, что на поздних стадиях инфекции антитела к структурным белкам ВИЧ могут отсутствовать при значительном уровне антител к оболочечным белкам. Представляется поэтому разумным рассматривать генно-инженерный р24 как отдельный диагностикум на антитела к gag-антигену, либо как составную часть универсального диагностикума на СПИД. Включение в такой диагностикум р24 является, на наш взгляд, обязательным, если учесть незначительную антигенную вариабельность gag-антигена.

Отсутствие ложноположительных результатов свидетельствует о том, что в препарате антигена нет примесей, способных связы-

вать антитела к бактериальным белкам, присутствующим в сыроворотке здорового человека. Следовательно, дальнейшая очистка препарата не нужна. В настоящее время проводится работа по замене разработанного для очистки антигена метода препаративного электрофореза на традиционные хроматографические приемы.

Выводы

1. Методами генной инженерии получен штамм *E.coli*, синтезирующий значительные количества рекомбинантного полипептида, несущего антигенные детерминанты основного внутреннего белка ВИЧ.
2. Применение препаративного ЭФ в ПААГ позволяет получать препарат высокой степени чистоты.
3. Использование препарата очищенного антигена для обнаружения антител к р24 позволяет существенно повысить специфичность иммуноферментного метода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gallo R. et al. // Science. - 1984. - V. 224. - P. 500-502.
2. Ratner L., Haseltine W., Patarka R. // Nature. - V. 313. - P. 277-284.
3. Sarngadharan M., Popovic M., Bruch L. // Science. - 1984. - V. 224. - P. 506-508.
4. Букринский М.И., Барсов Е.В., Жданов В.М. // Доклады АН СССР. - 1987. - Т. 296. - С. 77-80.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА С ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К МИКОБАКТЕРИЯМ ТУБЕРКУЛЕЗА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ВИДА И ВАКЦИННОГО ШТАММА ВСГ

М.В.Андросова, И.Н.Трахт, М.А.Владимирский

Московский НИИ туберкулеза Минздрава РСФСР

Для получения убедительных результатов при определении вида микобактерий рекомендуется проводить комплексные исследования, включающие как биохимические, так и биологические методы. Однако сложность этих исследований, особенно для прак-

тических лабораторий, диктует необходимость разработки значительно более быстрых, без наращивания бактериальной биомассы, надежных и безопасных методов [2].

Успешно применяемые для идентификации некоторых бактерий высокочувствительные и быстрые иммунологические методы, основанные на обнаружении видовых различий с помощью иммунной сыворотки животного, непригодны для определения видовой принадлежности микобактерий, т.к. микобактерии разных видов имеют большое количество общих антигенов [7,10]. Для их идентификации необходимы антитела к видоспецифическим детерминантам поверхностных антигенов.

Известно несколько зарубежных публикаций о получении моноклональных антител (МКА) к антигенам микобактерий [3,5,8,11], в том числе с индивидуальной специфичностью к антигенам микобактерий туберкулеза человеческого вида [4,6] и "диких" изолятов микобактерий туберкулеза бычьего вида [9]. Однако указанные МКА специфично взаимодействуют лишь с так называемыми соникатами (надосадками разрушенных ультразвуком микобактерий).

Целью нашего исследования было получение МКА, взаимодействующих с *M. tuberculosis*, выделенными от больных туберкулезом людей и микобактериями вакцинного штамма BCG, а также разработка эффективного метода их идентификации.

Мышей линии BALB/c иммунизировали семикратно в течение 5 месяцев авирулентными штаммами *M. tuberculosis* H37Ra и *M. bovis* (BCG), цельными клетками и их соникатами (полурастворимые антигены, полученные после центрифугирования при 5000 г разрушенных ультразвуком бактериальных клеток).

Накануне гибридизации проверяли титр антител в сыворотке иммунизированных животных методом твердофазного радиоиммунного анализа (РИА). Для гибридизации отобрали мышь с наибольшим уровнем антимиkobактериальных антител (1:6250) в сыворотке крови.

Слияние клеток селезенки иммунных мышей с клетками миеломы P₃01 в соотношении 5:1 (соответственно) проводили с помощью полиэтиленгликоля (3350).

Первичный отбор клонов-продуцентов антител проводили с помощью РИА на поливиниловых пластинах, сенсibilизированных

смесью соникатов инактивированного гамма-облучением штамма *M. tuberculosis* H37Rv и микобактерий вакцинного штамма BCG. Доля отвечающих первичных популяций от общего их числа (500) при первых двух проверках составила 20 %. Однако в ходе дальнейшего культивирования лишь 32 клеточные популяции сохранили способность секретировать антитела. Испытание культуральных жидкостей этих гибридом с антигенами-соникатами 8 различных видов микобактерий позволило обнаружить 4 популяции, продуцирующих МКА, специфичные в отношении микобактерий бычьего вида (BCG) и музейного вирулентного штамма Bovinus-8 и I популяцию клеток-продуцентов антител, реагирующих главным образом с *M. tuberculosis* H37Rv. Интересующие нас популяции дважды клонировали методом предельных разведений и после накопления *in vitro* вводили мышам BALB/c, подготовленным внутривенной инъекцией 0,5 мл вазелинового масла для индукции асцитов и получения МКА в препаративных количествах. Из асцитной жидкости МКА выделяли с помощью 2,53 М раствора сульфата аммония. Преципитат собирали центрифугированием, растворяли его в фосфатно-солевом буфере, диализовали и определяли концентрацию белка по Лоури, после чего проверяли специфичность и активность методами РИА и иммуноферментного анализа (ИФА).

Нами опубликованы данные [1], из которых следует, что МКА четырех независимо полученных гибридом высокоспецифично связывались с антигенами-соникатами микобактерий туберкулеза бычьего вида (BCG и Bovinus-8). Эти иммуноглобулины не взаимодействовали с антигенами *M. tuberculosis* H37Rv, а МКА пятой гибридомы проявляли специфичность к антигенам сониката *M. tuberculosis* H37Rv и практически не реагировали с антигенами, полученными из разрушенных ультразвуком микобактерий туберкулеза бычьего вида (BCG и Bovinus-8) и атипичных микобактерий.

Таким образом, полученные нами МКА дифференцировали *M. tuberculosis* H37Rv и *M. bovis* (BCG и Bovinus-8).

Для характеристики видоспецифических антигенных компонентов *M. tuberculosis* и *M. bovis* (BCG) был использован метод иммуноблоттинга. Микобактериальные белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с градиентом концентрации от 10 % до 20 % в присутствии додецилсульфата натрия, а затем электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную бумагу.

гу, которая последовательно обрабатывалась МКА, кроличьей антитышиной сывороткой, мышиными МКА против пероксидазы совместно с пероксидазой (комплекс ПАП), а затем субстратом для пероксидазы - 2-бром-1-нафтолом с H_2O_2 .

В результате были получены следующие данные:

МКА клона 62Д (название соответствует номеру во Всесоюзной коллекции клеточных культур г. Ленинграда) - IgG2a - взаимодействующие с белком, молекулярная масса которого составляет примерно 81 кД.

МКА 59Д (ВСКН) - IgG2a и 60Д (ВСКН) - IgG1 направлены к белкам (белку), молекулярная масса которых составляет примерно 63 кД. На основании различий этих антител в ИФА с антигенами *M. bovis* BCG (первые негативны по отношению к цельным бактериальным клеткам, в то время, как вторые - активно с ними реагируют) мы полагаем, что антитела указанных клонов направлены к разным эпитопам одного и того же белка или принадлежащим двум сходным по молекулярной массе полипептидам.

МКА клона 61Д (ВСКН) - IgG1 взаимодействуют с детерминантой, принадлежащей двум белкам с молекулярной массой около 63 кД и 60 кД.

Антиген, идентифицируемый МКА IgG1 - IgG1, входит в состав белка с молекулярной массой около 50 кД.

МКА пяти указанных клонов были испытаны в иммуноферментном тесте с цельными микобактериями 9 видов, включающих *M. tuberculosis* (музейный штамм H37Rv и "клинические" культуры), *M. bovis* (BCG, Bovinus-8 и "дикие" изоляты от больных туберкулезом коров) и атипичные микобактерии (табл. I).

Установлено, что антитела клона 62Д сохраняют способность взаимодействовать с *M. tuberculosis* H37Rv. Они же успешно реагировали и с "клиническими" штаммами микобактерий туберкулеза человеческого вида, выделенными от больных туберкулезом людей. Эти антитела не реагировали с атипичными микобактериями, а связывание с микобактериями туберкулеза бычьего вида (BCG и Bovinus-8) было незначительным.

Из 4 других клонов-продуцентов антител, специфичных к антигенам *M. bovis* (BCG и Bovinus-8), выделенным после ультразвуковой обработки, только антитела клона 60Д взаимодействовали с цельными бактериями этих штаммов. При изучении связывания

Таблица I

Специфичность связывания моноклональных антител с цельными
микобактериями туберкулеза в ИФА

Название штаммов микобактерий	Показатель оптической плотности ($M \pm m$)				
	Антитела клона 59Д 50 мкг/мл	Антитела клона 60Д 50 мкг/мл	Антитела клона 61Д 50 мкг/мл	Антитела клона IFI 50 мкг/мл	Антитела клона 62Д 50 мкг/мл
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0,00	0,00	0,00	0,00	0,95 \pm 0,05
"Клинические" штаммы, выделенные от больных людей (n=72)	0,00	0,07 \pm 0,05	0,00	0,05 \pm 0,01	1,37 \pm 0,14
<i>M. bovis</i> (BCG)	0,2 \pm 0,01	1,37 \pm 0,05	0,02 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02
<i>M. bovinus</i> -8	0,1 \pm 0,01	1,10 \pm 0,05	0,00	0,07 \pm 0,03	0,04 \pm 0,03
Культуры, выделенные от больных туберкуле- зом коров (n=6)		0,00			0,00
<i>M. kansasii</i>	0,1 \pm 0,01	0,13 \pm 0,03	0,00	0,09 \pm 0,01	0,00
<i>M. fortuitum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M. intracellulare</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M. avium</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M. scrofulaceum</i>	0,00	0,00	0,00	0,15 \pm 0,02	0,00
<i>M. smegmatis</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

последних антител с микобактериями, полученными из казеозных очагов убитых коров, т.е. "дикиими" штаммами микобактерий туберкулеза бычьего вида, было установлено, что антитела клона 60Д с ними не взаимодействуют.

Таким образом, антитела клона 60Д проявляют специфичность к цельным микобактериям туберкулеза вакцинного штамма BCG и музейного штамма Bovinus-8, оставаясь негативными в отношении других испытанных видов микобактерий.

Для безопасности и упрощения проведения ИФА с микобактериями по их идентификации был предложен способ инаktivации бактерий без повреждения видоспецифической антигенной детерминанты. Для этого 1-2 мг бактериальных клеток, используемых для анализа, обрабатывали хлороформом в течение не менее 4 часов. После 4-часовой обработки хлороформом микобактерии туберкулеза не обладали вирулентностью, о чем свидетельствовали 6 пассажей на морских свинках, и утрачивали способность к росту на питательных средах (Школьниковой и Левенштейна-Йенсена). Более продолжительная обработка хлороформом, возможно, приводила к повреждению антигенов, т.к. полученные МКА не взаимодействовали с обработанными таким образом микобактериями туберкулеза.

В процессе многочисленных исследований по видовой идентификации обнаружилось, что не все микобактериальные клетки надежно сорбируются на пластике 96-луночных пластин. Для устранения этого недостатка пластины стали обрабатывать 0,001 % раствором поли-L-лизина, что значительно повысило воспроизводимость результатов до 98,3 %.

Видоспецифичное связывание МКА клона 62Д с поверхностными антигенами *M. tuberculosis*, а МКА клона 60Д - с *M. bovis* (BCG) в твердофазном ИФА позволяет, в отличие от ранее полученных МКА [4,9], реагирующих с растворимыми (соникатами) антигенами микобактерий туберкулеза, использовать антитела полученных нами штаммов для быстрой и производительной идентификации указанных видов микобактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андросова М.В., Трахт И.Н., Владимирский М.А., Приймак А. А. // Антибиотики и химиотерапия. - 1988. - Т. XXXIII. -

№ 5. - С. 352-355.

2. Макаревич Н.М., Благодарный Я.А., Ильина Т.Б., Лотоцкая Р.А., Сидоркина Э.В., Кершиманова Б.Ф., Блехман И.М. // Сборник трудов ЦНИИТ. - Москва, 1981. - Т. XXXI. - С. 33-38.
3. Andersen A.B., Yuan L.B., Haslov K., Vergmann B., Benned-
sen Y. // J. Clin. Microbiol. - 1986. - V. 23. - P. 446-
-451.
4. Coates A.R.M., Hewitt Y., Allen B.W., Ivanyi Y., Mitchis-
son D.A. // Lancet. - 1981. - P. 167-169.
5. Daniel T.M., Raja A., Olds G.R. // Tuberculosis and Res-
piratory Diseases. / XXVith International Union Against
Tuberculosis. Singapore, 1986. - P. 56-59.
6. Kolk A.H.J., Minh L.H., Klaster P.R., Eggelte T.A., Kui-
per S., Younge S., Leeuwen Y.V. // Clin. Experiment. Im-
munol. - 1984. - V. 58. - P. 511-521.
7. Lind A. // Int. Arch. Allergy. - 1960. - V. 17. - P. 300-
-322.
8. Minden P., Kelleher P.Y., Freed Y.H., Nielsen L.D., Bren-
nan P.Y., McPherson L., McClatchy Y.K. // Infect. Immunol.
- 1984. - V. 46. - P. 519-525.
9. Morris Y.A., Thorns C.Y., Wooley Y. // J. General Micro-
biol. - 1985. - V. 131. - P. 1825-1831.
10. Topley W.W.G., Wilson G.S. // Principles of Bacteriology,
Virology and Immunity. - 1975. - P. 582-584.
11. Young D.B., Khanolkar S.R., Barg L.L., Buchanan T.M. //
Infect. Immunol. - 1984. - V. 43. - P. 183-188.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ФИТОВИРУСОВ

Т.Н.Плечко, А.В.Кириллов

Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина
АН СССР, Москва

Моноклональные антитела (МКА) широко используются как эф-
фективное средство диагностики возбудителей различных заболе-
ваний, в том числе вирусов сельскохозяйственных растений. На

основе МКА можно создать диагностические наборы, которые позволяют достаточно быстро и просто производить большое число анализов растительного материала на зараженность вирусами. Преимуществом МКА перед поликлональными сыворотками является возможность получения в больших количествах стандартного препарата антител с высокой чувствительностью, а также возможность поставить производство МКА на промышленную основу.

В настоящей работе в качестве антигенов были взяты слабо-накапливающиеся вирусы сельскохозяйственных растений: вирус мозаики резухи (ВМР или *Arabis mosaic virus*) и А-вирус картофеля (АВК). Препараты вирусов были предоставлены сотрудниками кафедры вирусологии МГУ им. Ломоносова.

Учитывая небольшое количество антигенов, имеющееся в наличии, первоначально иммунизация была проведена однократно непосредственно в селезенку мыши линии ВАЛВ/с (40 мкг очищенного вируса) [1]. Однако, как оказалось в дальнейшем, при таком способе иммунизации все полученные антитела относились к классу IgM, что не совсем удобно для их использования в диагностических целях. Это, по-видимому, связано с тем, что за 4 суток после иммунизации успевает развиваться только первичный иммунный ответ.

Поэтому в дальнейшем была проведена еще и иммунизация по общепринятой схеме: 3-кратная внутривентральная инъекция по 50 мкг очищенного препарата вируса с 2-х недельными интервалами между иммунизациями. В последний раз в мышь вводили 50 мкг антигена без адъюванта Фрейнда за 4 суток до гибридизации.

Для гибридизации использовали миеломные линии X63.Ag.8.653 и РА1. Гибридизации проводили по общепринятой схеме с использованием ПЭГ-1500. Селезенку одной мыши использовали для 2-3 гибридизаций: 2/3 суспензии спленоцитов замораживали в эмбриональной сыворотке теленка (ЭСТ) с 15 % диметилсульфоксида (ДМСО). В течение года клетки иммунной селезенки, хранившиеся в жидком азоте, сохраняли способность к гибридизации. Часть клонов, продуцирующих МКА, были получены из замороженных ранее клеток селезенки.

Тестирование полученных гибридов проводили методом прямого иммуноферментного анализа (ИФА) и методом "сэндвич"-ИФА с использованием иммуноглобулинов, очищенных из сыворотки кро-

лика, иммунизированного вирусом. Метод "сэндвич"-ИФА давал более надежные результаты, т.к. в этом случае можно достоверно отобрать клоны, продуцирующие МКА, которые не дают перекрестных реакций с другими фитовирусами.

После повторного клонирования 5×10^6 – 10^7 гибридных клеток вводили в мышей линии BALB/c, которым за 7–10 дней до этого была сделана внутрибрюшинная инъекция пристана (0,5 мл). Через 2–3 недели отбирали асцитную жидкость.

Антитела класса IgM очищали двукратным осаждением ПЭГ 6000 с последующим диализом против фосфатного буфера с 0,5 M NaCl pH 7,4 [2]. Очистку МКА класса IgG проводили путем осаждения сульфатом аммония с последующей хроматографией на DEAE-52 целлюлозе в Трис-HCl 0,02 M, pH 8,0 буфере. Элюцию вели линейным градиентом 0–0,2 M NaCl в том же буфере. Пик, содержащий МКА, определялся методом ИФА и при необходимости концентрировался путем осаждения 50 % сульфатом аммония с последующим диализом против фосфатного буфера.

Степень очистки МКА определялась электрофоретически.

Классы и подклассы полученных МКА определяли методом двойной диффузии в 2 % агаре. К АВК были получены 3 МКА, относящиеся к классу IgM. К ВМР были получены 2 МКА класса IgM и 5 МКА, относящихся к IgG1 и IgG2a подклассам.

С двумя МКА к АВК – 3В6.7 и 3А3.5 (IgM) и с одним МКА к ВМР – 1А10.3 (IgM) были получены конъюгаты с пероксидазой хрена (ПХ). К ПХ в концентрации 5 мг/мл добавляли по каплям 0,1M NaIO_4 и в течение 20 минут встряхивали в темноте. Затем проводили диализ против ацетатного буфера, pH 4,4, в течение ночи. МКА в концентрации 5 мг/мл, прогретые при 56°C 30 минут, смешивали с ПХ, предварительно доведя pH обоих компонентов до 9,0–9,5 0,2 M Na_2CO_3 . Реакция шла 2 часа в темноте. Ее останавливали добавлением раствора NaNH_4 в воде, 4 мг/мл. После диализа против фосфатного буфера, pH 7,4, конъюгат выделяли гель-фильтрацией на Сефадексе G-200 в фосфатном буфере, pH 7,4.

При сравнении различных классов МКА для определения фитовирусов в очищенных препаратах и соке растений были опробованы различные варианты "сэндвич"-ИФА (рис. 1–4).

Как было показано, МКА класса IgM к АВК и ВМР могут быть

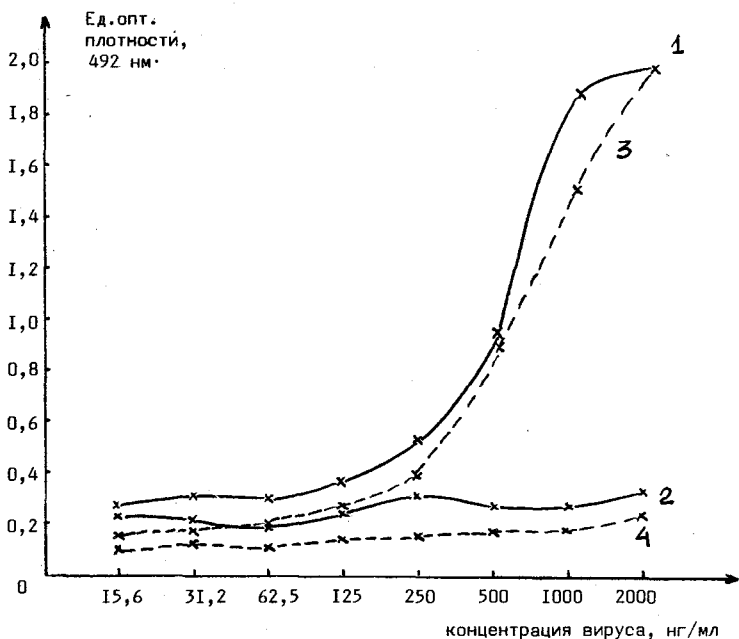


Рис. 1. Результаты "сэндвич"-ИФА для очищенного препарата ВМР с использованием МКА 1A10.3 (IgM). Для контрольной кривой вместо ВМР взят вирус мозаики люцерны. Субстраты ОФД (кривые 1 и 2) и аминоантипирин (кривые 3 и 4).

использованы для определения вирусов, однако такой анализ имеет ряд недостатков. Во-первых, при использовании этих МКА наблюдалась высокая фоновая реакция в контрольных опытах с соком здорового растения. Поэтому чувствительность МКА класса IgM не была достаточно высокой и составляла в лучших случаях 60-70 нг/мл вируса (при использовании очищенного препарата в качестве антигена). Примерно одинаковый уровень чувствительности оставался при использовании разных субстратов для ПХ: орто-фенилендиамина (ОФД) и аминоантипирина. Во-вторых, как показали опыты, МКА класса IgM не работали при использовании в "сэндвич"-ИФА в качестве "нижнего" антитела поликлональных

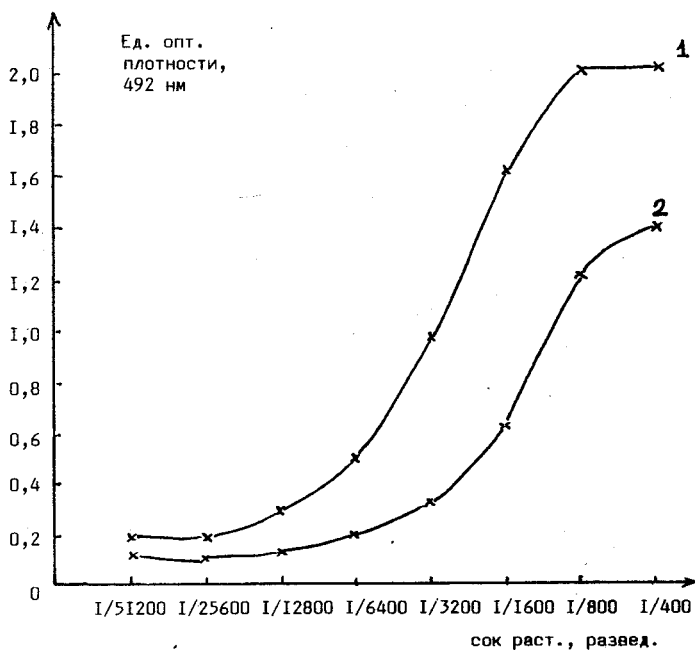


Рис. 2. Результаты "сэндвич"-ИФА с соком растения, зараженного ВМР, с использованием МКА 1A10.3 (IgM) (1). Контрольная кривая (2) с соком здорового растения. Субстрат ОФД.

антител из сыворотки кролика или МКА класса IgG. Реакция наблюдалась только при использовании "внизу" МКА класса IgM или вообще без "нижнего" антитела, т.е. при непрямом ИФА.

МКА класса IgG показали гораздо большую чувствительность при использовании их в "сэндвич"-ИФА. С их помощью можно было определить по крайней мере 1-2 нг/мл вируса в очищенном препарате.

В настоящее время авторы ведут работу по подбору оптимального варианта "сэндвич"-ИФА с возможным использованием смеси нескольких МКА для повышения чувствительности и эффективности определения фитовирусов в соке растений.

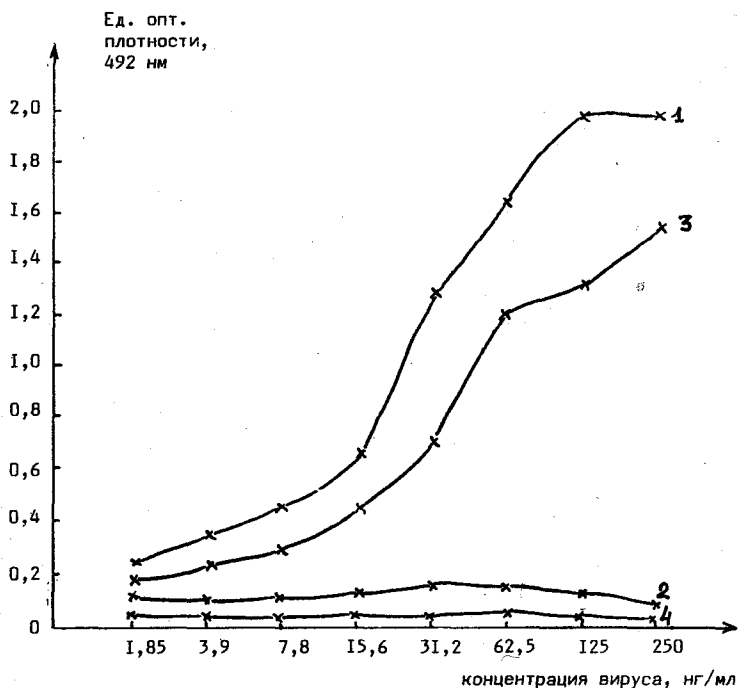


Рис. 3. Результаты "сэндвич"-ИФА для очищенного препарата ВМР с использованием МКА 3В4 и ID4 (IgG). Для контрольных кривых вместо ВМР взят вирус мозаики ксеноподиума. Субстрат ОФД.

- 1 - кривая титрования ВМР с МКА 3В4;
- 2 - контрольная кривая для МКА 3В4;
- 3 - кривая титрования ВМР с МКА ID4;
- 4 - контрольная кривая для МКА ID4.

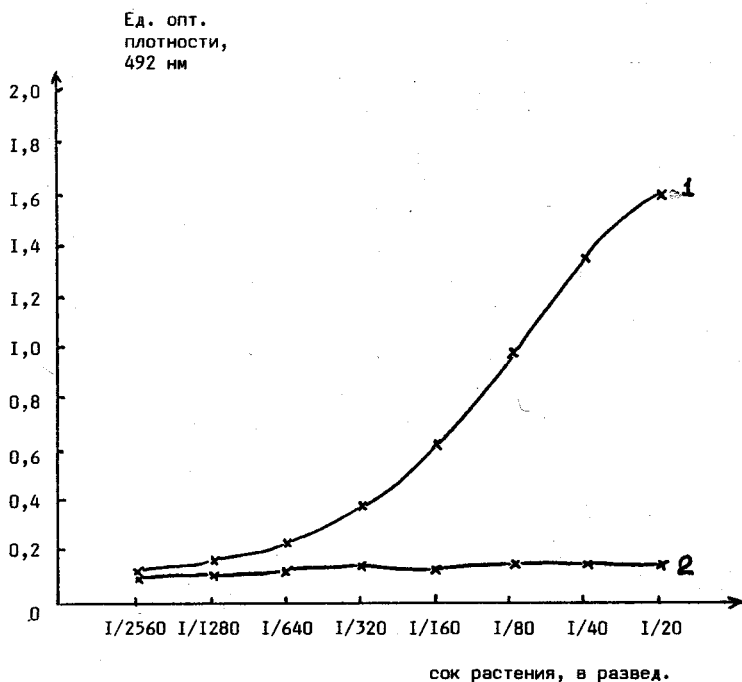


Рис. 4. Результаты "сэндвич"-ИФА с соком растения, зараженного ВМР, с использованием МКА ЗВ4 (IgG) (I). Контрольная кривая с соком здорового растения. Субстрат ОФД.

ЛИТЕРАТУРА

1. Spitz M. et al. // J. Immunol. Meth. - 1984. - V. 70. - P. 39-43.
2. Neoh S.H. et al. // J. Immunol. Meth. - 1986. - V. 91. - P. 231-235.

ИММУНОАФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПРЕПАРАТОВ ВИРУСА
ГРИППА НА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛАХ К СТРУКТУРНЫМ
КОМПОНЕНТАМ ВИРИОНА

Е.А.Полякова, С.А.Синева, О.И.Иващук, А.В.Трофимов,
А.Н.Полторак, Л.П.Коробицын

ВНИИ особо чистых биопрепаратов, Ленинград

Выделение гемагглютини́на (ГА) и нейраминидазы вируса гриппа - основных поверхностных антигенов вириона, определяющих его патогенность, имеет большое практическое значение в связи с использованием их в биохимических, иммунологических, серологических и других исследованиях. Кроме того, они применяются для изучения механизма взаимодействия вируса с поверхностью клетки-хозяина, получения моноклональных антител (МКА) с целью изучения антигенных свойств различных подтипов вируса гриппа, а также для создания субъединичных вакцин. Получение очищенных М-белка (матриксного белка) и NP-белка (белка нуклеокапсида) вируса гриппа представляет также значительный интерес. Удобным методом получения чистых антигенов является иммуноаффинная хроматография на иммобилизованных моноклональных антителах. Практически неограниченный источник антител позволяет синтезировать препаративные (до нескольких литров) количества сорбентов, а высокое сродство матрицы к индивидуальным антигенам приводит к удалению иммунохимически детектируемых примесей.

Целью настоящей работы явилась разработка схемы последовательного получения высокоочищенных препаратов гемагглютини́на (ГА), нейраминидазы (НА), белка нуклеокапсида и матриксного белка.

В работе использовали штамм вируса А/Ленинград/385/80, который предварительно концентрировали и очищали ультрацентрифугированием.

Октилглюкозид синтезировали по известной методике [1]. Иммобилизацию МКА на Сефарозу 4В-CL проводили по методике [2] с использованием бромциана в качестве активирующего агента.

Поверхностные антигены вируса выделяли с помощью обработки вирусной суспензии 1 % раствором октилглюкозида в течение

30 минут при комнатной температуре с последующим центрифугированием при 100000 g субвирусных частиц.

Хроматографию вели в присутствии 0,1 % Тритона X-100 [3].

Активность НА определяли тиобарбитуровым методом [4].

ГА и NP-белки определяли твердофазным ИФА с использованием МКА к ГА и NP.

Неионный детергент октилглюкозид отличается от других детергентов неионного типа высокой критической концентрацией мицеллообразования и, видимо, не так прочно связывается с белками, как, например, Тритон X-100. В результате солюбилизации поверхностных антигенов вируса гриппа на электрофореграмме видны лишь зоны тяжелой цепи (GA_1), легкой цепи (GA_2) и НА. Не видимые на электрофореграмме примесные количества NP-белка обнаруживаются с помощью иммуноферментных методов.

Исходный вирус в восстанавливающих условиях разделялся на Р-белки (P_1 - P_3), NP-белок, М-белок, GA_1 и GA_2 . В невосстанавливающих условиях NP- и М-белки не меняют своего положения, а в области 90 кД появляется полоса ГА, не распадающаяся на GA_1 и GA_2 . Выше ГА видны полосы олигомеров $(GA)_2$ и $(GA)_3$. Диффузная полоса GA_1 маскирует полосу, соответствующую НА, поскольку содержание ГА в вирусе превышает содержание НА (соответственно 30 и 3-6 %).

Смесь поверхностных антигенов вируса гриппа разделяли на колонке с иммобилизованными МКА к GA_1 . Процесс вели, не насыщая сорбент по ГА, чтобы в проскаке получить НА, свободную от примесей ГА. Выход НА составлял 70-80 % от теоретического. От следовых количеств NP-белка в препарате НА освобождались на колонке с иммобилизованными МКА к NP-белку. Элут 3 М тиоцианатом калия с аффинного сорбента представлял собой очищенный NP-белок вируса гриппа, в проскаке с колонки получали иммунохимически чистый препарат нейраминидазы. Элуты с колонки с иммобилизованными антителами к ГА рехроматографировали на этом же сорбенте в режиме насыщения по ГА: таким образом получали иммунохимически чистый ГА.

Полученные препараты вирусных антигенов содержали 0,1 % Тритон X-100. Его удаляли на ионообменнике DEAE-TSK в режиме сорбции белкового материала при щелочных значениях pH, отмывке от детергента посадочным буфером, элюцией белкового материала 1 М хлористым натрием в посадочном буфере.

Результаты электрофореза и проявления моноклональными антителами препаратов вирусных антигенов, препарата ГА показали, что поскольку МКА имеют сродство к GA_2 , то во всех препаратах они проявляют тяжелую цепь ГА, либо мономер ГА, в составе которого находится GA_2 . Аналогичным образом проводился ИФА-анализ на НР-белок. Для получения очищенного препарата М-белка мы успешно использовали метод препаративного электрофореза в полиакриламидном геле. С этой целью субвирусные частицы осадка, образовавшегося после экстракции Р-белка дезоксихолатом и центрифугирования, растворяли в буфере для электрофореза, наносили на гель, вели процесс, затем вырезали из геля полосу, соответствующую по положению М-белку, и вели электроэлюцию М-белка из геля, в ходе которой из белкового препарата одновременно удалялся детергент.

ЛИТЕРАТУРА

1. Noller K., Rockwell M. // TACS. - 1938. - V. 60. - P. 2076-2077.
2. Cuatrecasas P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1971. - V. 44. - P. 178.
3. Полторак А.Н., Мартюшин С.В., Пасечник В.А. // Биотехнология. - 1986. - № 6. - С. 48-52.
4. Aminoff D. // Virology. - 1959. - V. 7. - P. 355.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ И ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

И.А.Разумов, Е.В.Протопопова, А.В.Перебоев, В.Б.Локтев
ВНИИ молекулярной биологии, Кольцово Новосибирской обл.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является возбудителем одного из широко распространенных в Европе и Азии инфекционного заболевания, переносимого членистоногими. Среди европейских стран более существенная заболеваемость по данным ВОЗ зарегистрирована в СССР, ЧССР и Австрии. Высокая медицинская и общественная значимость данного заболевания остро ставит вопрос о своевременной диагностике и идентификации вирусных

антигенов. Это побудило нас приступить к формированию коллекции гибридом, секретирующих моноклональные антитела (МКА) к вирусу клещевого энцефалита и оценки возможности использования полученных МКА для обнаружения и идентификации антигенов данного вируса.

Результаты и их обсуждение

Гибридомы, секретирующие антитела к вирусу клещевого энцефалита получали в результате слияния миеломы NS-I с клетками селезенки иммунных мышей BALB/c. Гибридизацию проводили с использованием ПЭГ-1000, по стандартной методике [2].

Отбор и тестирование положительных гибридом и их клонов проводили методом твердофазного радиоиммунного анализа с использованием ^{125}I -меченного белка А [1]. Шесть гибридом, секретирующих МКА к ВКЭ были клонированы методом предельных разведений [3]. (Гибридомы Е6В, ЕА4 и ЕВ1 были любезно предоставлены В.В.Рожке и П.П.Лактионовым, Институт биоорганической химии СО АН СССР). В коллекцию гибридом включались клеточные линии, имеющие удовлетворительные культуральные характеристики и отвечающие следующим требованиям: обладающие способностью стабильно секретировать специфические МКА после двух месяцев непрерывного культивирования *in vitro*, сохраняющие продукцию антител после контрольной разморозки, не дающие клонов, несекретирующих МКА после клонирования гибридомы методом предельных разведений (при анализе не менее 10 клонов).

Все полученные гибридомы стабильно прививались в брюшную полость мышей BALB/c, предварительно обработанных пристаном или вазелиновым маслом. Доза клеток 5×10^6 на животное обеспечивала 100 % образование асцита в брюшной полости, объем которого колебался от 1,5 до 8,5 мл.

В таблице I представлены некоторые свойства полученных препаратов МКА. Высокие титры МКА в препаратах асцитных жидкостей говорят о высоком сродстве взаимодействия антител с антигеном.

Это позволило нам провести модельные эксперименты по оценке возможности МКА для обнаружения и детекции антигенов ВКЭ. Был выбран непрямой вариант ТРИА с использованием антивидовых антител и меченого белка А. Очищенный вирусный антиген коли-

Таблица I

Титрование МКА к вирусу клещевого энцефалита
методом ТРИА

№ п.п.	Наимено- вание гибридо- мы	Специ- фич- ность МКА	Суб- класс секре- тир.им- муногло- бул.	Титр МКА в ТРИА (обр.велич.)	
				Антиген ВКЭ, штамм Софьин	Антиген ВКЭ, штамм 205
1.	IC6	ВКЭ	IgG2a	24300	16200
2.	IE10	"	IgG2A	24300	16200
3.	ID3	"	IgG2A	48600	24300
4.	E6B/G9	E	IgG1	218700	72900
5.	EVI	E	IgG1	145800	72900
6.	E4A/C2	E	IgG1	72900	24300
7.	Антисыво- ротка к ВКЭ	ВКЭ	-	48600	48600

Примечание: Субкласс МКА определяли при помощи иммунодиффузии по Оухтерлони с использованием моноспецифических антисывороток. Специфичность МКА определяли методом иммуноблоттинга по Roehrig et al. [4]. В таблице представлены данные 3-4 экспериментов. В качестве препаратов МКА использовались асцитные жидкости соответствующих гибридом.

чеством иммобилизовался на поверхности пластиковых 96-луночных микроплат и далее последовательно обрабатывался моноклональными антителами, вторыми антителами и меченым белком А. Результаты опытов представлены в таблице 2 и говорят о том, что МКА E6B/G9 и E4A/C2 уверенно обнаруживают 7 нг вирусного антигена в пробе, при удельной активности используемого белка $A \cdot 1-2 \times 10^7$ расп/мкг белка. В аналогичных условиях поликлональная гипериммунная антисыворотка против ВКЭ обладает сходной выявляющей способностью.

Таблица 2

Обнаружение антигена ВКЭ методом непрямого ТРИА
с использованием МКА и суммарной антисыворотки

Количество вирусного антигена (нг/проба)	Соотношение опыт/контроль при использовании антител против ВКЭ		
	МКА Е6В/Г9	МКА Е4А/С2	ГАМ
600	38,2	7,4	32,6
200	35,5	7,1	27,6
67	20,0	6,8	14,9
22	6,2	4,4	4,2
7	2,3	2,1	2,4
2	1,7	1,6	1,1
0,8	1,5	1,1	0,9
0,3	1,0	1,0	1,2

Примечание: В эксперименте использовался очищенный белок Е ВКЭ штамм Софьин; МКА Е6В/Г9 в виде асцитной жидкости и гипериммунная сыворотка мыши (ГАМ) в разведении 1:1000, а МКА Е4А/С2 1:100. В каждую лунку вносили 1×10^5 расп/мин меченого белка А.

Выводы

1. Получена коллекция из 6 гибридом, стабильно секретирующих МКА к вирусу клещевого энцефалита.

2. МКА при их использовании в ТРИА позволяют обнаруживать до 7 нг вирусного материала в пробе и по выявляющей способности не уступают поликлональной гипериммунной антисыворотке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Frankel M.E., Gerhard W. // Mol. Immunol. - 1979. - V. 16. - P. 101-106.
2. Geffer M.L., Marquilies D.H., Scharff M.D. // Somatic Cell Genet. - 1977. - V. 3. - P. 231-236.
3. Lerner F.A. // The Yale J. Biol. Medicine. - 1981. - V. 54. - P. 387-402.
4. Roehring J.T., Mathews J.H. // Virology. - 1985. - V. 145. - P. 347-356.

ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОМ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К СТРУКТУРНЫМ БЕЛКАМ ВИРУСА ГРИППА

С.А.Синева, А.В.Трофимов, Е.А.Полякова, О.И.Ивашук,
А.Н.Полторак, Л.П.Коробицын

ВНИИ особо чистых биопрепаратов Минмедбиопрома СССР,
Ленинград

Представлены данные первого этапа работ по получению семейства гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКА) к вирусу гриппа с целью их дальнейшего использования в диагностических целях и для выделения вирусных белков в высокоочищенном виде. В двух сериях слияний спленоцитов иммунных мышей с клетками мышинной миеломы Sp2/0 получены 12 стабильных гибридомных продуцента, синтезирующие МКА к гемагглютнину (ГА) и NP белку вируса гриппа.

Материал и методы

Для иммунизации и накопления асцитической жидкости, содержащей МКА, использовались 12-недельные мыши линий BALB/c и DBA.

Иммунизация проводилась: 1) аллантоисной жидкостью зараженных вирусом гриппа куриных эмбрионов; 2) вирусом, очищенным в градиенте плотности сахарозы; 3) фракцией вирусных белков, обогащенной М и NP белками. Получение последней осуществлялось обработкой очищенного вируса октилглюкозидом с дальнейшим центрифугированием. Отдиализованный осадок содержал преимущественно М и NP белки, а супернатант - поверхностные белки вируса гриппа, т.е. гемагглютинин и нейраминидазу.

Отбор клонов проводился с помощью твердофазного иммуноферментного анализа в 4 параллельных тестах: 1) на вирусе, разрушенном 1 % раствором додецилсульфата натрия (ДСН); 2) на фракции вирусных белков, обогащенной гемагглютинином и нейраминидазой; 3) на фракции, обогащенной М и NP белками; 4) на овальбумине в качестве контрольного антигена. Конечная концентрация белка в препаратах антигенов при посадке на плату составляла 1 мкг/мл. Платы с внесенными по 50 мкл антигенами инкубировали на шейкере 1 час при комнатной температуре, отмывали 2 раза буфером, содержащим 0,05 % NP-40, и помещали в лунки

Таблица I

Характеристика МКА полученных гибридом

Название клона	Изотип проду- цируе- мых МКА	Результаты ИФА на различных антигенах для установления специфичности*					Специфич- ность
		вирус, разру- шенный ДСН	ГА _I	ГА ₂	НА	NP	
V2C9	M	+	н/о	н/о	н/о	+/-	ГА
V2D6	M	+	+	н/о	+	+	ГА
V3B2	G2A	+	-	-	-	-	NP**
V3E7	G2A	+	-	-	-	-	NP
V3G10	G1	+	-	-	-	-	NP**
V7H9	G3	+	+	+	+/-	+/-	ГА
V11D7	M	+	+	+	+/-	+/-	ГА
V18G10	M	+	+	+/-	+/-	+/-	ГА
V22C3	MG3	+	+	+	+/-	+/-	ГА
V24B4	G1	+	-	-	-	+	NP
V25B4	G2A	+	-	-	-	+	NP
V25C4	G2A	+	-	-	+	-	ГА

*Использовали фракции, обогащенные соответствующими белками

**предположительно, поскольку МКА имеют в ИФА характеристики, совпадающие с данными по клону 3Е7, специфичность которого к NP установлена в иммуноаффинной хроматографии.

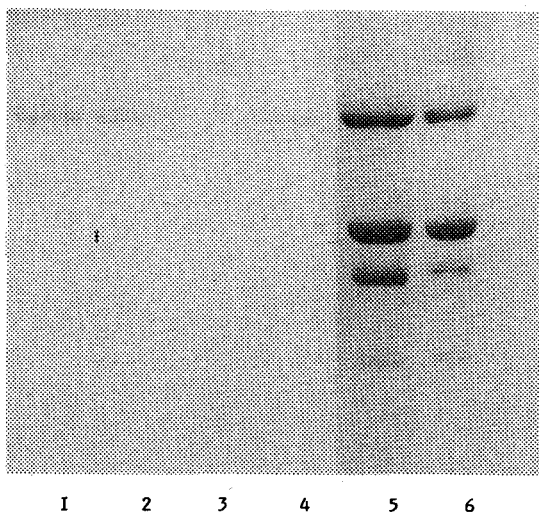


Рис. I. Идентификация моноклональных антител к белкам вируса гриппа методом иммуноблоттинга.

На всех дорожках подвергали электрофорезу белки исходного вируса, образцы №№ 1-4 переносили на нитроцеллюлозу и обрабатывали МКА к гемагглютнину и белку нуклеокапсида, проявляли конъюгатом кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши с пероксидазой хрена. Образцы №№ 5 и 6 после электрофореза окрашивали Кумасси.

1, 2 - обработка 24В4 антителами (моноклональными к Р-белку; 1 - в невосстанавливающих условиях, 2 - в восстанавливающих.

3, 4 - обработка 25С4 антителами (моноклональными к гемагглютнину); 3 - в невосстанавливающих условиях, 4 - в восстанавливающих.

Таблица 2

Результаты РТГА МКА некоторых гибридом к гемагглютнину*
(концентрация МКА - 1 мкг/мл, наименьшее разведение МКА
- 1:200, в опытах использовали 4 АЕ штаммов вируса гриппа)

Сери- под- тип	Ш т а м м ы	Титры в РТГА в обратных величинах с моноклонами			
		7Н9	11Д7	25С4	18Г10
В	1. В/Ленинград/369/75	-	-	-	-
HSWN1	2. А/SW/1/76	-	+/-	-	800
HON1	3. А/PR/8/34	800	+/-	-	3200
	4. А/ВеI/42	-	400	+/-	400
	5. А/Ленинград/32/52	-	-	-	+/-
	6. А/Ленинград/26/81	-	+/-	-	200
	7. А/Ленинград/23/81	-	-	-	+/-
	8. А/Киев/11875/84	-	-	-	-
H1N2	9. А/Хабаровск/90/77	-	-	-	-
	10. А/Прага/1/84	-	-	-	-
	11. А/Тайвань/1/86	-	-	-	-
	12. А/Ленинград/624/86	-	-	-	-
H2N2	13. А/Сингапур/1/57	-	-	-	-
	14. А/Ленинград/549/80	-	-	-	-
	15. А/Ленинград/553/80	-	-	-	-
H3N2	16. А/Гонгконг/1/68	-	200	12800	-
	17. А/Юдорн/307/72	400	3200	-	3200
	18. А/Бангкок/1/69	-	200	12800	-
	19. А/Филиппины/2/82	-	-	3200	-
	20. А/Ленинград/385/80	-	400	400	400
	21. А/Ленинград/289/83	-	-	12800	-
	22. А/Москва/2847/86	-	-	6400	400
	23. А/Ленинград/130/88	-	-	-	-

* данные получены А.Н.Ветласениным (Институт гриппа МЗ СССР)

по 50 мкл образцов МКА (культуральная среда, разбавленная NP -буфером в 2-3 раза). После часовой инкубации и двукратной отмывки NP -буфером в лунки вносили по 50 мкл кроличьих антител к мышинным иммуноглобулинам, меченных пероксидазой хрена. После еще одной часовой инкубации несвязывающийся конъюгат отмывали и добавляли раствор субстрата (ортофенилендиамина). Изотипы МКА определяли с помощью коммерческого набора реактивов. Процедура слияния проходила в стандартных условиях в присутствии полиэтиленгликоля [1].

Результаты

Отобранные стабильные клоны были охарактеризованы в дополнительном иммуноферментном анализе с применением обогащенных по GA_1 (тяжелая цепь гемагглютинина), GA_2 (легкая цепь гемагглютинина), NP , HA (нейраминидаза) фракций вирусных белков и в вестерн-блоттинге. Определены изотипы продуцируемых антител.

Полученные данные суммированы в таблице I и проиллюстрированы фотографией (рис. I). МКА накоплены пассированием клонов в мышах, очищены, и на их основе созданы иммуноаффинные колонки для выделения чистых NP -белка и гемагглютинина [2]. Способность некоторых из них реагировать с гемагглютинином различных штаммов вируса гриппа была изучена в реакции торможения гемагглютинации (табл. 2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Westerwoudt R.J., Naipal A.M., Harrison C.M.H. // J. Immunol. Meth. - 1984. - V. 68. - P. 89-101.
2. Полякова Е.А., Синева С.А., Иващук О.И., Трофимов А.В., Полторак А.Н., Коробицын Л.П. // Материалы Всесоюзной конференции "Генная и клеточная инженерия в решении фундаментальных проблем биотехнологии". - Тарту, 1989. - Т. II. - С. 174-176.

ГИБРИДОМЫ И МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА III

ПАНЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ МАРКЕРОВ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИ ОЦЕНКЕ ИММУННОГО СТАТУСА

П.С.Бачурин, Н.А.Маркова, Н.Е.Сурнакова,
А.Ю.Кирюхин, А.В.Филатов

Институт иммунологии Минздрава СССР, Москва

Получена панель моноклональных антител к поверхностным антигенам лимфоцитов человека. Специфичность антител устанавливалась на основании данных о реактивности антител с клетками различных органов и тканей, клетками опухолевых линий, экспериментов по взаимной блокировке, комодуляции антигенов, двухцветной иммуофлуоресценции, а также по результатам влияния антител на функциональную активность лимфоцитов. Молекулярные массы антигенов определяли методом радиоиммунопреципитации с последующим НДС-ПААГ электрофорезом.

Идентифицированы антитела против CD2, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD11, CD21, HLA-DR антигенов. Из них антитела против CD2 и CD5 антигенов взаимно блокируются с антителами Leu1 и Leu5, соответственно; антитело против CD8 антигена частично блокируется антителами Leu2 и OKT8, а антитело против CD4 практически не блокируется антителами Leu3 и OKT4.

Полученные антитела использовались при оценке субпопуляционной структуры лимфоцитов у больных с иммунологической недостаточностью.

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Д.Ф.Глузман, В.А.Надгорная, И.В.Абраменко, А.И.Евсеева,
Л.М.Скляренко, О.В.Юрченко, Л.Ю.Полудненко, Г.В.Писнячевская

Институт проблем онкологии им. Р.Е.Кавецкого
АН УССР, Киев

Развитие методов гибридной технологии и получение моноклональных антител (МКА) к спектру линейно-специфических и дифференцировочных антигенов лейкоцитов человека и клеток других тканей способствовало более широкому внедрению иммуноферментных цитохимических методов в клиническую практику.

Первоначально нами на основе использования отечественных реагентов был отработан иммунопероксидазный метод определения антигенов на поверхностных мембранах лимфоидных клеток, выделенных в градиенте плотности фиколл-верографина, имеющий несомненные преимущества по сравнению с обычно применяемым непрямым иммунофлуоресцентным методом [1]. Позднее способ был модифицирован, что позволило использовать его для изучения субпопуляции лимфоцитов непосредственно в обычных мазках периферической крови, пунктатов и отпечатков полученных при биопсии лимфатических узлов, клеток экссудатов из серозных полостей [2].

Преимущества метода несомненны. Сокращается время подготовки материала к иммуноцитохимическому окрашиванию за счет исключения этапов выделения и отмывки клеток. Помимо реагентов, необходимых для проведения реакции (первичных МКА, связывающей антисыворотки, комплекса пероксидаза-антипероксидаза, или ПАП-комплекса), обычного светооптического микроскопа и холодильной установки с температурой -20°C , не требуется других специальных реактивов и оборудования. Сохранность антигенов поверхностных мембран при длительном хранении (несколько месяцев) при -20°C позволяет проводить иммуноцитохимические исследования не только сразу после получения материала, но и в любое удобное для исследователя время. Препараты с проведенными иммуноцитохимическими реакциями могут длительно храниться и пригодны для повторных просмотров. Немаловажное значение имеет, что при этом достигается точная морфологическая иденти-

фикация клеток, содержащих те или иные поверхностные или цитоплазматические антигены.

Метод является одновременно высокоинформативным и простым, пригодным для массовых исследований, проводимых в обычных клинико-диагностических и иммунологических лабораториях. Прежде всего, он позволяет проводить анализ субпопуляций Т- и В-лимфоцитов при врожденных и приобретенных иммунодефицитах, аутоиммунных нарушениях, болезнях иммунных комплексов, аллергических, инфекционных заболеваниях, изучении вопросов трансплантационного и противоопухолевого иммунитета. Метод можно использовать при проведении диспансеризации лиц с повышенным риском возникновения тех или иных заболеваний, а также лиц, подвергающихся действию факторов, способных оказать неблагоприятное воздействие на иммунологическую реактивность организма. При этом возможно проведение иммунологического обследования людей, у которых по разным причинам невозможно взять для исследования пробы венозной крови (например, у новорожденных детей).

Особенно перспективно применение метода в комплексе с цитохимическими реакциями в диагностических исследованиях в гематологической и онкологической клинике. В частности, он может быть использован для уточненной дифференциации различных форм лимфопролиферативных заболеваний, прежде всего лимфоидных форм острых лейкозов, злокачественных лимфом; для оценки полноты ремиссии и раннего распознавания рецидивов заболевания. У больных с различными формами солидных новообразований он может быть применен с прогностической целью при анализе клеток лимфатических узлов при наличии метастазов, для изучения фенотипических субпопуляций лимфоцитов, гистиоцитов и макрофагов, инфильтрирующих ткань опухоли и обнаруживающихся в экссудатах в серозных полостях; при оценке влияния химиопрепаратов и лучевой терапии на показатели иммунологической реактивности больных.

Цитологические препараты для иммуноцитологического типирования готовили из капли крови: взятой из пальца, путем смешивания ее на стекле с равным количеством раствора гепарина. При низком содержании лейкоцитов у исследуемых лиц (менее $5 \times 10^9/\text{л}$) готовили лейкоконцентрат венозной крови, используя

в качестве антикоагулянтов гепарин (10-50 ед/мл крови) или трилон Б (0,5 мл в 5 мл крови). Качество приготовления мазка имеет большое значение для всех последующих этапов. Затем мазки высушивали в течение 3-6 ч на воздухе при комнатной температуре, заворачивали каждый в отдельности в алюминиевую фольгу и хранили при -20°C . На следующие сутки (или спустя более продолжительное время) препараты доставали из холодильника, доводили до комнатной температуры 10-20 мин, затем разворачивали из фольги и фиксировали 30 сек. в забуференном формол-ацетоне (рН 6,6). Затем препараты промывали последовательно по 5-10 мин в 2 сменах забуференного фосфатным буфером, рН 7,2-7,4, физиологического раствора (ЗФР).

Сразу после фиксации проводили иммунопероксидазное окрашивание препаратов по схеме: первичные МКА - 1 ч, вторичная антисыворотка - 30 мин, ПАП-комплекс - 30 мин, повторное нанесение вторичной антисыворотки на 15 мин и ПАП-комплекса - на 15 мин. Реагенты в количестве 0,05 мл наносили на стекло в пределах очерченного стеклоглафом круга. В качестве контроля на одном из участков вместо первичных МКА наносили нормальную сыворотку мышей. Все этапы инкубации осуществлялись во влажной камере при комнатной температуре. После каждого из них стекла промывали в ЗФР, его избыток снимали фильтровальной бумагой и не давая клеткам полностью высохнуть, наносили следующий реактив.

Первичные МКА (таблица I) применяли в обычных для реакции иммунофлуоресценции разведениях. Вторичная антисыворотка (кроличья сыворотка против иммуноглобулинов белой мыши) и ПАП-комплекс входили в состав ПАП-набора, выпускаемого Горьковским НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РСФСР. В ряде случаев ПАП-комплекс готовили *ex tempore*, используя МКА к пероксидазе хрена, полученные в ЦНИРРИ Климовичем В.Б. и соавторами.

После проведения всех этапов инкубации определяли активность пероксидазы по методу Graham, Karnovsky: 5 мг 3,3'-диаминобензидин тетрахлорида растворяли в 10 мл ЗФР и добавляли 0,02 мл 3 %-ного раствора свежей перекиси водорода. Мазки инкубировали в смеси 5-10 мин при комнатной температуре. Ядра клеток докрашивали 2 %-ным раствором метиленового зеленого

Таблица I

МКА, использованные для иммуноферментативного
окрашивания цитологических препаратов

МКА	Специфичность	Источник получения
I	2	3
ИКО-I	Ia-подобный антиген	ВОНЦ АМН СССР
ИКО-02	Недифференцированные бласты	Там же
ИКО-10	Предшественники Т-бластов	- " -
ИКО-II	Лимфоцитарный функция-ассо- циированный антиген	- " -
ИКО-13	Тимоциты	- " -
ЛТ-1	Зрелые Т-лимфоциты	Институт иммунологии МЗ СССР
ЛТ-8	Т-супрессоры/киллеры	Там же
1В4	В-лимфоциты и часть Т-лим- фоцитов крови	- " -
ИПО-3	Антиген В-бластов	Институт проблем онко- логии АН УССР
ИПО-4	Антиген лимфобластов	Там же
ИПО-5	Неполиморфная детерминанта HLA-ABC	- " -
ИПО-10	Дифференцировочный антиген В-клеток	- " -
ЛТ-9	Рецептор к трансферрину	Институт иммунологии МЗ СССР
ЛТ-7	CD7-антиген	Там же
ЛТ-4	Т-лимфоциты-хелперы/ин- дукторы	- " -
ЛБ 21	CD21-антиген	- " -
3F3	Дифференцировочный антиген В-лимфоцитов	- " -
H4	Широкий спектр кератинов человека	ВОНЦ АМН СССР
30'	Виментин	Там же
G ₅	РЭА	- " -
P ₁₀	РЭА	- " -
F	РЭА	- " -
C ₁₂	РЭА	- " -

(продолжается)

Продолжение таблицы I

I	2	3
C ₁₀	РЭА	ВОНЦ АМН СССР
ИКО-22	Антиген эпителиальных мембран	Там же
JOR-CEA5	РЭА	р. Куба
B6.2	Гликопротеид с мол. массой 90 кД	США

или гематоксилином. Клетки, обладающие исследуемым антигеном, легко выявлялись при просмотре препарата, так как имели ободок коричневого цвета по краю цитоплазмы.

При изучении экссудативной жидкости процесс приготовления цитологических препаратов и их фиксация несколько изменялись. Каплю клеточной суспензии помещали во влажную камеру при 4°С на 15 мин, снимали избыток надосадочной жидкости, высушивали под вентильатором. Для определения экспрессии антигенов поверхностных мембран фиксировали препараты в парах 3 %-ного раствора формальдегида 3 мин. Для выявления белков цитоскелета фиксировали в течение 5 мин, наливая на стекло 3 %-ный раствор формальдегида, затем промывали ЗФР и обрабатывали препарат 0,5 %-ным раствором тритона X-100 в ЗФР в течение 5 мин при комнатной температуре.

При исследовании мазков периферической крови 27 здоровых людей в возрасте 24-56 лет экспрессия Ia-подобного антигена обнаружена на поверхностных мембранах 20,1±2,9 лимфоцитов, антигена, выявляемого МКА ИКО-II, на 5,6±2,0 клеток, реагирующего с МКА ИКО-13 на 2,6±1,2. Содержание в крови зрелых Т-лимфоцитов, реагирующих МКА ЛТИ, было 51,1±3,2 %. ЛТ8⁺ клеток (Т-лимфоцитов-супрессоров) - 31,7±2,0 %, антиген, выявляемый МКА IB4, был выявлен на 40,8±3,9 % клеток (В-лимфоцитах и части Т-клеток). С МКА ИПО-10, полученными сотрудниками нашей лаборатории С.П.Сидоренко и Е.П.Ветровой, реагировали 11,2±1,1 % клеток, с ИПО-5 - 68,0±7,3 %, с ИПО-4 - 7,5±1,6 % лимфоцитов. Было также установлено, что антигены, выявляемые МКА ИПО-3, ИКО-02, ИКО-10, на клетках периферической крови здоровых людей-доноров не экспрессируются. Приблизительно таким же бы-

ло относительное содержание в крови различных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, выявляемых непрямым иммунофлуоресцентным методом. Все же, учитывая более высокую специфичность и чувствительность ПАП-метода по сравнению с методом непрямой иммунофлуоресценции, именно ему следует отдать предпочтение при изучении экспрессии слабо выраженных антигенов на мембранах злокачественно трансформированных клеток при различных формах гемобластозов.

При остром лейкозе на первом этапе для разделения миелоидных и лимфоидных форм, характеризующихся различным прогнозом и чувствительностью к терапии, мы применяем общепринятые цитохимические методы (определение активности пероксидазы, хлор-ацетатэстеразы, неспецифической эстеразы, окраску на гликоген и липиды).

Далее на основе определения рецепторов и антигенов поверхностных мембран проводится выделение вариантов острого лимфобластного лейкоза с учетом их клеточного происхождения (предполагаемых нормальных клеток-аналогов на тех или иных стадиях дифференцировки Т- и В-лимфоцитов). На основе перечисленных выше цитохимических признаков и данных иммуноцитохимического определения поверхностных и внутрицитоплазматических иммуноглобулинов (тяжелых и легких цепей), применения МКА ИПО-10 (к антигенам, экспрессированным на клетках В-ряда от ранних предшественников до плазматических клеток), ИКО-35 (к так называемому антигену острого лимфобластного лейкоза общего типа, О-ОЛЛ-антигену), и анти-Т-клеточных МКА серии ИКО (ВОНЦ АМН СССР) и ЛТ (Институт иммунологии МЗ СССР) мы выделяем следующие основные варианты острого лимфобластного лейкоза: нуль-клеточный, пре-В-клеточный, ОЛЛ "общего типа" (ОЛЛ), Т-клеточный и В-клеточный. При первых трех на большинстве бластных клеток экспрессирован Ia-подобный антиген, выявляемый МКА ИКО-1, и антиген, взаимодействующий с МКА ИПО-10. При пре-В-клеточном варианте ОЛЛ в цитоплазме клеток дополнительно определяются μ -тяжелые цепи иммуноглобулина при отсутствии κ - и λ -легких цепей и на поверхностных мембранах бластных клеток в большинстве случаев О-ОЛЛ-антиген. При О-ОЛЛ суп^- клетки обладают только О-ОЛЛ-антигеном. Все три отмеченных варианта возникают из ранних клеток-предшественников В-ряда. Крайне ред-

кий В-ОЛЛ происходит из более зрелых клеток, на поверхностных мембранах которых содержится IgM. На долю Т-клеточного варианта, при котором прогноз столь же тяжелый, как и при В-ОЛЛ, приходится до 20 % всех наблюдений. На поверхностных мембранах лейкозных Т-бластов отмечается экспрессия тех же антигенов, что выявляются на клетках-предшественниках этого ряда на внутритимических стадиях дифференцировки.

Еще одним примером эффективного использования иммуноцитохимических методов с диагностической целью служат результаты изучения мазков из серозных экссудатов у онкологических больных.

Одной из важных задач цитологической диагностики является выделение злокачественных клеток в экссудатах из серозных полостей и дифференциальная диагностика опухолей эпителиальной и мезотелиальной природы. Основным методом, используемым в настоящее время с этой целью, является изучение препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимзе или по Паппенгейму. Однако, когда количество злокачественных клеток мало, они располагаются изолированно и не обладают выраженными признаками атипии, перед цитологом возникают диагностические трудности.

Известно, что, по крайней мере 15-30 % всех образцов серозных жидкостей оцениваются неверно. Для повышения точности диагностики делались попытки использовать цитохимические, электронномикроскопические и цитогенетические методы, но ни один из них не оказался достаточно надежным. Начиная с 1979 г. с этой целью применяются иммуноцитохимические методы и МКА против антигенов эпителиальных клеток.

Изучение экссудатов из плевральной полости проведено нами у 29 больных, находившихся на лечении в Городском пульмонологическом центре на базе клинической больницы № 17 г. Киева.

МКА к различным эпитомам РЭА показали высокую специфичность в отношении раковых клеток - они не взаимодействовали с элементами реактивного мезотелия. Однако в четырех из 17 случаев (23 %) метастазы аденокарцином в плевральную полость показывали ложно-отрицательный результат. Аналогичные показатели были получены *Waltz et al.*, отметившими положительную реакцию с анти-РЭА МКА лишь в 69 % случаев метастазов рака в плевральную полость.

МКА против гликопротеида с мол. массой 90 кД связывались с опухолевыми клетками в 12 из 15 случаев (80 %). Положительная реакция с клетками мезотелия не отмечена. Сочетанное применение этих МКА и МКА, направленных против РЭА, позволило снизить число недиагностируемых случаев до 6,25 % (отрицательный результат получен в 1 из 16 случаев). В целом, с применением дополнительно и цитохимических методов, мы смогли подтвердить диагноз в 16 из 17 (94,1 %) случаев цитологически установленного метастатического поражения плевральной полости, а также обнаружить изолированные раковые клетки в одном цитологически негативном экссудате (впоследствии у больного на основании данных рентгенологического исследования и бронхоскопии была выявлена опухоль легкого). Мы полагаем, что дальнейшее совершенствование способов выявления опухолевых клеток в экссудатах будет достигнуто при включении в панель и комплексном использовании МКА против других опухоле-ассоциированных; в том числе и онко-фетальных, антигенов.

Рецептор к трансферрину был обнаружен на опухолевых клетках во всех изученных случаях. Однако часто в экссудатах встречались активированные лимфоидные клетки среднего и большого размера, иммунобласты, также взаимодействующие с МКА ЛТ-9, поэтому при наличии изолированных, вне комплексов и скоплений, крупных и средних клеток, экспрессирующих рецептор трансферрина, трудно сделать вывод об их происхождении. Более того, клетки реактивного мезотелия, способного к пролиферации, могут связываться с МКА ЛТ-9, что и было отмечено нами в двух случаях.

МКА ИКО-22, направленные против антигена эпителиальных мембран, обнаружили слабую реактивность с опухолевыми клетками в экссудатах, лишь в трех из девяти случаев выявлено слабое окрашивание, более заметное в местах клеточных контактов. Реакции с мезотелиальными клетками также не установлено. В то же время МКА ИКО-22 реагировали с лимфоплазматоидными, плазматическими клетками и гистиоцитами. Реакция была интенсивной, позволяющей четко визуализировать эти клеточные элементы, часто незаметные при просмотре мазков, окрашенных по Паппенгейму. Вероятно, МКА ИКО-22 взаимодействуют с эпитопом антигена эпителиальных мембран, более выраженном на лимфоидных и гис-

тиоцитарных клетках, чем на собственно эпителиальных.

Антигены гистосовместимости I класса были обнаружены как на мезотелиальных, так и на большинстве опухолевых клеток, и, следовательно, МКА, направленные против них, не являются перспективными для дифференциации этих клеточных типов.

Таким образом, среди использованных нами иммунологических маркеров для различения злокачественных эпителиальных и мезотелиальных клеток можно применять определение на поверхностных мембранах клеток экспрессии РДА и гликопротеида с мол. массой 90 кД. С помощью МКА, направленных против них, и цитохимических реакций удалось идентифицировать раковые клетки в 16 из 17 случаев метастазов аденокарцином в плевральную полость, а также в одном из четырех цитологически негативных экссудатах у онкологических больных.

Приведенные примеры иллюстрируют некоторые аспекты возможного применения иммуоферментных цитохимических методов и отечественных МКА в диагностических цитологических исследованиях. Актуальным представляется широкое внедрение указанных методов в практику здравоохранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глузман Д.Ф., Надгорная В.А., Абраменко И.В. и др. // Эксперим. онкология. - 1986. - Т. 8. - № 6. - С. 46-49.
2. Абраменко И.В., Глузман Д.Ф., Сидоренко С.П. и др. // Эксперим. онкология. - 1988. - Т. 10. - № 2. - С. 43-46.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНОМУ АНТИГЕНУ НК-1 ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРОВ ЧЕЛОВЕКА

Н.Н.Аксенова, В.А.Плескач, В.А.Иванов, И.В.Кожухарова,
И.И.Фирулина, Т.Н.Игнатова, В.Я.Фель

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

Известно, что связанный с миелином головного мозга человека гликопротеид (МАГ) с молекулярной массой 110 кД играет роль в межклеточных взаимодействиях в нервной ткани [4], об-

лаждает антигенными детерминантами, общими для нервной и иммунной систем [2]. Кроме того, на МАГ представлены эпитопы, распознаваемые моноклональными антителами (МКА) Leu-7, которые взаимодействуют с дифференцировочным антигеном естественных киллеров (ЕК) человека **HNK-1** [4]. Исходя из этого была принята попытка получить МКА к ЕК, используя в качестве антигена препарат МАГ.

МАГ получали из белого вещества мозга человека методом Norton и Poduslo [5], освобождали от липидов и низкомолекулярных примесей, используя метод Quarles и Pasnak [6]. Основой метода является экстракция из белого вещества головного мозга глико- и липопротеидов раствором 0,32 М сахарозы и получения фракции нужной молекулярной массы в градиенте 0,32-0,85 М сахарозы при ускорении 75000 g. Осадок многократно промывали водой и вновь чистили в сахарозном градиенте, после чего лиофилизировали. Полученный лиофилизированный миелиновый белок делипидизировали смесью хлороформа с метанолом (3:1) и депротеинизировали фенолом с добавлением Li-диiodо-салицилата до 0,15 М для удаления низкомолекулярных примесей. Дальнейшая ступень очистки в наших экспериментах состояла в хроматографии на сефадексе G-200. Полученный белок с молекулярной массой 90-110 кД использовали для иммунизации мышей линии **BALB/c**. Схема иммунизации мышей была разработана в нашей лаборатории В.А.Ивановым.

В сыворотке крови иммунизированных мышей проверено наличие антител к белку МАГ. В реакции преципитации в агаре получена хорошая полоса преципитации при использовании 10-20 мкг белка на лунку и в 2 раза разведенной сыворотки крови. При тестировании иммуноферментным методом получена хорошая положительная реакция при использовании 0,7 мкг МАГ на лунку и разведении сыворотки крови 1:50, 1:100, 1:1000.

Спленоциты иммунизированной мыши сливали с клетками линии **Sp2/0** (в соотношении 5:1) с помощью этиленгликоля (молекулярная масса 1500) в соответствии с общепринятой методикой. После слияния смесь спленоцитов с клетками миеломы в гибридной среде помещали в 96-луночные панели с нанесенными макрофагами перитонеального экссудата мышей **BALB/c**. На следующие сутки в лунки добавляли равный объем гибридной среды с удвоенным

количеством компонентов среды ГАТ. Клоны гибридных клеток появлялись на 5-7 сутки после слияния в 50-70 % лунок. В эти сроки начинали замену среды ГАТ. Тестирование наличия в среде МКА проводили через 12-18 суток после слияния. Идентифицированные клетки-продуценты клонировали на питающих слоях макрофагов. Клетки-продуценты исходных и вторичных клонов гибридомы вели *in vitro* и замораживали в смеси 90 % эмбриональной сыворотки коров и 10 % DMSO.

Исходные и вторичные клоны гибридом проверяли на способность секретировать в среду антитела к МАГ иммуноферментным методом (ELISA). При тестировании использовали 0,5-0,6 мкг антигена (МАГ) на лунку, в качестве блокирующего белка - яичный альбумин, конъюгат пероксидазы с антимышиной сывороткой фирмы Sigma, краситель о-фенилендиамин. Кроме того, клетки гибридомы трансплантировали мышам линии BALB/c. В брюшной полости мышей образовывалась солидная и асцитная формы гибридомы, которые в дальнейшем использовали для получения асцитного варианта. От каждой мыши получали от 3 до 6 мл асцитической жидкости. При тестировании наличия МКА использовали как культуральную среду, так и асцитическую жидкость.

Способность МКА подавлять цитотоксическую реакцию ЕК крови человека исследовали в цитотоксическом уридиновом тесте [1,3]. В качестве клеток-мишеней действия ЕК клеток использовали культуру клеток К-562, меченных ^3H -уридином (35-40 Бк на 10^6 клеток). Клетки эффекторы получали из донорской крови человека в градиенте плотности фиколл-верографина. О цитотоксичности ЕК до и после обработки судили по изменению цитотоксического индекса, определяемого по формуле

$$(I - \frac{\text{радиоактивность опытной пробы}}{\text{радиоактивность в контроле}}) \times 100$$

Источником антител служила культуральная среда гибридных клеток или асцитическая жидкость из брюшной полости мышей BALB/c после инъекции им клеток гибридомы (F_0) или перевивки выросшей опухоли (F_1 и т.д.).

В результате проделанной работы было получено несколько клонов-продуцентов МКА. Один из них, оказавшийся наиболее активным, обозначен Н-10. Этот клон был реклонирован и клетки

этой гибридомы растут как в культуре, так и в виде опухоли на мышцах BALB/c. Начата работа по идентификации синтезируемых клоном Н-10 МКА к дифференцировочному антигену HNK-1 ЕК человека. Исследуется влияние МКА на активность ЕК клеток периферической крови человека.

В предварительных экспериментах оказалось, что при использовании в качестве источника МКА культуральной жидкости гибридомы клона Н-10 цитотоксическая активность ЕК клеток снижается или отменяется только в 50 % случаев. При использовании в качестве источника МКА асцитической жидкости подавление или отмена цитотоксического действия ЕК клеток происходит во всех экспериментах. Эффект не зависит от степени разведения асцитической жидкости в пределах 1:10, 1:100, 1:500. Кроме того, при тестировании культуральной жидкости клонов методом непрямой реакции поверхностной иммунофлуоресценции в модификации для пробирок, качественно показано, что на поверхности ЕК клеток определяются детерминанты, реагирующие с МКА к МАГ. Следовательно, есть основания полагать, что среди полученных МКА имеются МКА к HNK-1 антигену ЕК крови человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малыгин А.М., Апреликова О.Н. // Эксперим. онкология. - 1982. - Т. 4. - № 3. - С. 37-39.
2. Dobersen M.J., Gascon P., Trost S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1985. - V. 82. - No. 2. - P. 552-555.
3. Hashimoto G., Sudo H. // GANN. - 1971. - V. 62. - No. 1. - P. 139-145.
4. Garry R.C., Helfand S.L., Quarles R.H., Roder J.C. // Nature. - 1983. - V. 306. - No. 5941. - P. 376-378.
5. Norton W.T., Poduslo S.E. // J. Neurochem. - 1973. - V. 21. - No. 4. - P. 749-757.
6. Quarles R.H., Pasnak C.F. // J. Biochem. - 1977. - V. 163. - No. 3. - P. 635-637.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ЭРИТРОЦИТАРНОМУ АНТИ-
ГЕНУ ν F- ν СИСТЕМЫ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
(*Bos taurus*)

Е.В.Березкина, Т.Н.Игнатова, Т.М.Гринчук, Ю.Т.Паньшина,
А.П.Супрун, О.В.Милованов, А.Г.Паньшин, В.П.Павличенко

ВНИИ разведения и генетики сельскохозяйственных живот-
ных, Ленинград-Пушкин; Институт цитологии АН СССР,
Ленинград

Получение реагентов для типирования крупного рогатого ско-
та по группам крови на гибридной основе по сравнению с тра-
диционным методом имеет ряд преимуществ. Это удешевляет стои-
мость реагентов и одновременно повышает их качество: специфич-
ность, высокий титр, высокая чистота.

Гибридома 4C₇, продуцирующая моноклональные антитела к
эритроцитарному антигену ν F- ν системы крови крупного рогато-
го скота, была получена при слиянии клеток мышинной миеломы
Sp2/0-Ag14 и спленоцитов иммунизированных мышей линии BALB/c.
Схема иммунизации является оригинальной, так как учитывает
особенности используемого антигена, которым являются эритро-
циты крови крупного рогатого скота.

Культивирование клеток миеломы и полученной гибридомы про-
водили на среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной сыворот-
ки, 1 мМ неосновных аминокислот, 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ
глутамина, 5×10^{-5} М меркаптоэтанол и 40 ед/мл гентамицина
при температуре 37° С и 5-7 % CO₂.

В качестве сливающего агента использовали полиэтиленгли-
коль (ПЭГ) с молекулярным весом 1500. Соотношение клеток мие-
ломы и спленоцитов при слиянии 1:8. После обработки ПЭГ клет-
ки рассевали на 96-луночные платы в концентрации 1×10^4 клеток
миеломы на лунку. В качестве фидерного слоя были использованы
макрофаги, выделенные из перитонеального экссудата мышей ли-
нии BALB/c, прокультивированные в платах для слияния в тече-
ние 24 часов в концентрации 1×10^3 клеток макрофагов на лунку.

Для селекции гибридом была использована среда ГАТ.

Тестирование гибридом-продуцентов проводили постановкой
реакции гемолиза с кровью животного-донора и с панелью крови

специально подобранных животных с известным антигенным составом крови.

Для получения клона клетки гибридомы 4C₇ клонировали в 96-луночных платах методом предельных разведений.

Тип роста клеток гибридомы 4C₇ - суспензионный, способ культивирования - на флаконах Карреля, метод снятия - пипетирование, кратность посева - 1:3, посевная доза - 2×10^5 клеток/мл. Ростовые характеристики клеток гибридомы: время удвоения 36 часов, насыщающая плотность 10^6 клеток/мл.

Полученная гибридомой 4C₇ продуцирует иммуноглобулины класса IgG, определенные методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле.

Моноклональные антитела секретируются в культуральную среду, титр антител в культуральной жидкости 1:2x10³, в асцитной жидкости 1:10⁵, что определяется микрометодом гемолиза и стандартной постановкой реакции гемолиза в макротесте.

Реагент прошел испытания в Ленинградском головном племпредприятии на поголовьи из 100 животных и получил положительную оценку.

Результаты работы вошли в заявку на изобретение (приоритетная справка № 4373403/13 от 22.12.1987).

Разработанные приемы гибридомной технологии легли в основу проводимой в настоящее время работы по получению реагентов для типирования крупного рогатого скота по группам крови иной специфичности (к антигенам A₂ и H').

ЭКСПРЕССИЯ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭНОЛАЗЫ И КРЕАТИНКИНАЗЫ В ОРГАНОКУЛЬТИВИРОВАННЫХ ХРУСТАЛИКАХ ПЛОДОВ

С.А.Вероман, Я.С.-В.Казесалу, С.Ю.Халдре

Институт общей и молекулярной патологии Тартуского
госуниверситета

Основным метаболическим путем, снабжающим энергией клетки большинства органов, является гликолиз; энолаза - один из ферментов гликолитического пути. Энолаза димерный белок, который формируется из α-, β- и γ-субъединиц, из которых изоимы γγ-формы количественно характерны для нервной ткани. Фермент

креатинфосфокиназа также снабжает ткани энергией. Оба фермента количественно характерны для нервной ткани. Изучение нейроспецифических ферментов в линзе глаза представляет интерес, так как многие признаки - Вольфовская регенерация, присутствие кислого глиального фибриллярного белка и многие другие - сближают хрусталик именно с нервной тканью. Однако определение того или иного фермента в нормальном хрусталике вряд ли даст новые данные, так как в нем встречаются почти все описанные до сих пор в тканях ферменты [1]. В катарактальном же хрусталике образующиеся аномальные клеточные типы по содержанию в них ферментов не изучены. Изучение аномальных клеток с точки зрения энергетического обмена при помощи нейроспецифических ферментов, возможно, позволит осветить роль этих клеточных типов в биологии ткани хрусталика.

В настоящей работе источником аномальных клеток были органно-культивированные хрусталики плодов, где аномальные клетки встречаются относительно часто [2].

Материал и методика

Моноклональные антитела (МКА): в качестве МКА использовали МКА линии 9Д2Д9, специфические к нейроспецифической эналазе (НСЭ) человека, и МКА линий 5Д11В5, 1Г11В5 и 4Р5Ц10, специфические к изолизу ББ креатинфосфокиназы (КФК) человека. Все МКА конъюгированы с пероксидазой хрена фирмы "Сигма".

Хрусталики: органнокультивированные линзы глаза плодов свиньи длиной 10-20 см, выращенные 7-21 дней в искусственной среде по ранее описанной методике [2] и обработанные по рутинной гистологической технике до парафиновых срезов.

Иммуногистохимия: на сагиттальных срезах фиксированных в формалине хрусталиков провели прямую иммунопероксидазную реакцию на НСЭ, и на срезах фиксированных в растворе Карнуа хрусталиков провели прямую иммунопероксидазную реакцию на КФК.

Контроль: положительным контролем служили срезы мозга крысы, а отрицательным контролем - срезы скелетной мышцы крысы.

Результаты

В срезах нормального мозга и хрусталиков крысы выявлялись метки всех изученных нами иммунопероксидазной реакцией МКА.

НСЭ-специфические МКА локализовались в мозге в цитоплазме некоторых нейронов и глиальных клеток и дали слабо положительную реакцию в скелетной мышце. КФК-ББ-специфические МКА локализовались в цитоплазме части нейронов, глиальных клеток, эпителии сосудистого сплетения и в мягких мозговых оболочках, и дали слабую положительную реакцию на срезах скелетной мышцы (МКА линии 5Д11Б5). МКА линий 1Г11Б5 и 4Р5Ц10, специфические к КФК-ББ, локализовались в клеточных оболочках нейропиля и в околоядерной цитоплазме некоторых нейронов в виде глыбок, и не выявились в скелетной мышце.

Изученные МКА к нейроспецифическим белкам выявились в нормальном хрусталике крысы и плода свиньи. Они локализовались и в эпителии и в волокнах хрусталика, причем в молодых экваториальных удлиняющихся ядросодержащих волокнах их содержание было ниже, чем в остальных волокнах и эпителии. КФК-специфические МКА линии 1Г11Б5 выявились в хрусталике менее интенсивно по сравнению с остальными изученными МКА. Результаты о присутствии НСЭ и КФК в аномальных клетках хрусталика приведены в таблице I.

При сравнении присутствия НСЭ и КФК в нормальном и культивированном хрусталиках вытекает, что в обоих случаях они выявляются с приблизительно одинаковой интенсивностью как в эпителии, так и в волокнах. Зато в выявлении изученных ферментов в хрусталиковом эпителии и в возникших из него аномальных клетках имеются различия.

Содержание НСЭ в эпителиальных клетках варьирует от присутствия до полного отсутствия; в фибробластоподобных клетках оно отсутствовало и в пузырчатых клетках выражено слабо, что является свидетельством снижения гликолиза в названных клеточных типах. Снижение уровня НСЭ в пузырчатых клетках хорошо коррелирует со скоплением в этих клетках в культуре гликогена, судя по положительной гистохимической реакции на гликоген.

МКА линии 5Д11Б5, которые локализуются в цитоплазме клеток ткани мозга, присутствовали также в цитоплазме аномальных клеток хрусталика, однако в фибробластоподобных и инфильтрирующих клетках на более низком уровне, чем в других аномальных клетках. МКА линий 1Г11Б5 и 4Р5Ц10 к КФК в мозге локализовались преимущественно в клеточных оболочках нейропиля, а в хруста-

Таблица I

Выявление НСЭ и КФК в изученных тканях по данным прямой иммунопероксидазной реакции

Ткани	МКА	к НСЭ линии 9Д2Д9	к КФК линий:		
			5Д11В5	1Г11В5	4Р5Ц10
Мозг		+	+	+	+
Поперечнополосатые мышцы		±	±	-	-
Нормальный хрусталик		+	+	±	+
Культивированный хруст.: эпителий		±	+	±	+
волокна		+	+	±	±
аномальные клетки:					
1. эпителиоидные		+ → -	+	*	±
2. фибробласто-подобные		-	+ → -	-	-
3. инфильтрирующие		±	±	*	-
4. пузырьчатые		+ → ±	+	±	±

Обозначения знаков: + - положительная реакция; ± - слабая реакция; - - отрицательная реакция; * - нет данных; → - изменение интенсивности реакции от + до.

лике - в цитоплазме клеток. МКА 1Г11В5 выявились в культивированных и нормальных хрусталиках с одинаковой интенсивностью, а в фибробластоподобных клетках они отсутствовали. МКА линии 4Р5Ц10 к КФК выявились менее интенсивно в эпителиоидных и пузырьчатых клетках по сравнению с эпителием хрусталика и отсутствовали в фибробластоподобных и инфильтрирующих клетках.

Более низкое содержание изученных ферментов в аномальных клетках культивированных хрусталиков указывает на сниженный энергетический уровень этих клеток по сравнению с клетками нормальной линзы глаза. Можно полагать, что от низкого энергетического уровня зависит и ограниченная пролиферация аномальных клеток культивированного и катарактального хрусталиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hockwin O., Ohrlloff C. // In: Molecular and Cellular Biology of the Eye Lens. H. Bloemendal, ed. N.-Y., Chichester, Brisbane, Toronto, 1981. - P. 367-414.
2. Вероман С.А. // Бюлл. эксперим. биол. мед. - 1986. - С. 2. - С. 237-240.

СТРАТЕГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГИБРИДОВ, СЕКРЕТИРУЮЩИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К КЛЕТОЧ- НЫМ И РАСТВОРИМЫМ АНТИГЕНАМ

А.Ю.Волгин

Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

В последние годы для исследования разнообразных антигенных структур все более широко используются моноклональные антитела (МКА) - высокоомогенные и специфичные иммуноглобулины, продуцируемые искусственными клеточными линиями - гибридомами (Гб).

В лаборатории иммуногенетики ИМГ АМН СССР накоплен достаточно большой опыт получения Гб к различным клеточным и растворимым антигенам (АГ). Полученные Гб, как правило, отличаются высоким пролиферативным потенциалом и длительной секрецией МКА при культивировании *in vitro*.

По нашему мнению, при наличии хорошо отработанных методов слияния родительских клеток, первичного культивирования полученных гибридов и методов клонирования гибридом, на первый план выступают вопросы, связанные с иными аспектами их получения.

Эффективная иммунизация животных, чьи спленоциты используются в дальнейшем для получения гибридов, является необходимым условием для получения стабильных гибридом.

При получении МКА к антигенам клеточной поверхности наилучшие результаты были достигнуты при использовании следующей схемы иммунизации: 2-3 разовое введение АГ в относительно небольших дозах (5×10^5 - 5×10^6 клеток на мышь) с 7-10 дневными интервалами. Разрешающая инъекция составляла 5×10^8 - 5×10^9 кле-

ток на мышь с последующей гибридизацией на 3-4 сутки.

Для получения МКА к слабоиммуногенным АГ, а также при наличии ограниченного количества антигенного материала, мы получали наилучшие результаты при использовании внутриселезеночной иммунизации. Так, при получении МКА к $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -зависимой эндонуклеазе ядер спленоцитов человека иные схемы иммунизации оказались вообще неэффективными. В модельном эксперименте с использованием в качестве АГ эритроцитов барана было отмечено в среднем 8770 антителообразующих клеток (АОК) на селезенку с титром антител в сыворотке крови 1:512. В случае внутриселезеночного введения антигена было отмечено 57150 АОК на селезенку при титре 1:10000.

Другим важным аспектом в получении МКА является способ тестирования антител, адекватный поставленной задаче. По нашему мнению наиболее удачным является сочетание ряда методов определения МКА, основанных на различных свойствах получаемых антител. Например, при получении МКА к клеточным АГ - это лимфоцитотоксический тест и иммуноферментный анализ. При получении МКА к лимфоцитарным ферментам мы использовали способность антител фиксироваться на белке-А и связывать, в свою очередь, фермент к которому они направлены. Реакцию учитывали по наличию специфической активности связанного МКА фермента. Использование такого метода тестирования позволило сразу отобрать гибридомы, секретирующие МКА, которые были способны фиксироваться на белке-А, и в свою очередь, связывать изучаемый фермент, не влияя на его ферментативную активность.

Особенно важной, по нашему мнению, является стратегия длительного культивирования гибридом, которая заключается в манипулировании скоростью клеточной пролиферации в зависимости от поставленных задач. Было замечено, что если для получения хороших результатов при начальных этапах культивирования полученных гибридов, их клонирования, быстрой наработки клеточной массы, необходим высокий уровень клеточной пролиферации, то на этапах длительного культивирования при наработке МКА высокий пролиферативный уровень не является необходимым. Для проверки этого предположения был проведен ряд экспериментов. Изучали взаимосвязь скорости клеточной пролиферации, определяемой по включению H^3 -тимидина и по нарастанию клеточ-

ной массы, с нарастанием титра антител. Содержание МКА оценивалось по различным методам, в зависимости от свойств антител и их специфичности (ИФА, РГА, ЦТТ).

Установлено, что наличие высокой клеточной пролиферации, обусловленной обогащенными средами и сыворотками, содержащими высокое количество ростовых факторов, не увеличивало, а при ряде условий снижало, наработку МКА в культуральной среде. Этот эффект был обусловлен резким ухудшением условий для жизнедеятельности клеток (нарушение микроциркуляции, сдвиг кислотно-щелочного равновесия, накопление продуктов жизнедеятельности клеток) из-за резкого увеличения клеточной массы, что вело к снижению жизнеспособности Гб и последующей гибели. Напротив, помещение Гб в условия полного отсутствия ростовых факторов в питательной среде (культивирование в среде, лишенной сыворотки) не сказывалось на способности Гб к синтезу МКА, что позволяло нарабатывать в культуральной среде МКА, не "загрязненные" сывороточными белками. Жизнеспособность клеток при этом также снижалась.

Для долговременного культивирования Гб с целью наработки МКА наиболее оптимальными условиями являются культивирование на необогащенных средах типа "Игла" с добавлением 5-10 % сыворотки крупного рогатого скота. Относительно невысокая скорость клеточной пролиферации, с одной стороны, позволяет накопиться в культуральной среде высокому уровню МКА - до 15-20 мкг/мл, с другой, в меньшей степени сказываются факторы клеточной дивергенции, обусловленные наличием мутации и тем, что клетки, утратившие способность к секреции антител, обладают селективным преимуществом по отношению клеток секреторов.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ФАКТОРУ VIII СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

В.С.Горностаев, А.Б.Олимпиева, А.О.Данилов, Б.Г.Торопова,
Д.Ф.Нягулов, А.В.Глебов, З.М.Чистякова, В.В.Окулов,
П.В.Хролова, Л.П.Папаян

НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова МЗ СССР, НИИ гематологии и переливания крови МЗ РСФСР, Ленинград

Фактор VIII (Виллебранда) – белковый комплекс, участвующий в процессе свертывания крови, продуцируется главным образом эндотелиальными клетками кровеносных сосудов и является специфическим иммунохимическим маркером этих клеток. Целый ряд гематологических заболеваний связан с нарушением структуры и функций фактора VIII (гемофилия А и болезнь Виллебранда). Диагностика таких заболеваний в большой степени может быть облегчена путем применения антител к фактору VIII и его субъединицам. Кроме того, поскольку фактор VIII является маркером эндотелиальных клеток, антитела к нему могут оказать существенную помощь в дифференциальной диагностике опухолей мягких тканей, в частности, идентифицировать опухоли сосудистого генеза [1]. Также представляется очень перспективной возможность применения таких антител для терапии тромбозов при различных заболеваниях [2], в том числе при онкологических, где тромбозы рассматриваются как состояния, способствующие метастазированию.

В настоящей работе получены гибридомные клоны, растущие в среде, содержащей вместо телячьей эмбриональной сыворотки другой источник ростовых факторов.

В качестве партнера при гибридизации использовали миеломную мышиную линию х63Ag8-653A, адаптированную к росту в такой среде (В.Б.Климович, ЦНИРРИ МЗ РСФСР, Ленинград).

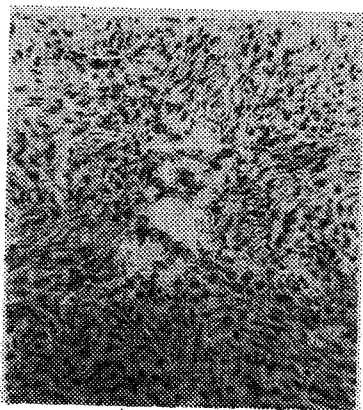
Фактор VIII выделяли из крови человека по методу Циммерман и соавт. [3] с рядом собственных модификаций, позволяющих получить более очищенный препарат. Мышей линии BALB/c I, 5-2 месячного возраста иммунизировали дважды, одновременно в/бр. и п/к, с интервалом в 3 недели (I иммунизация антигеном в смеси с полным адъювантом Фрейнда, 2-я без адъюванта). Слияние спленоцитов иммунизированной мыши с клетками линии



А



Б



В

Рис. 1. Выявление эндотелия (указано стрелками) пуповинной вены (А) и сосудов кожи (Б) человека с помощью моноклональных антител к фактору VIII. Отсутствие окрашивания эндотелия пуповинной вены человека (В), с помощью моноклональных

антител к антигену Т-лимфоцитов человека Рап-Т. ПАП-метод, докрасивание гематоксилином. х200.

x63Ag8-653A проводили через 72 часа после последней иммунизации, и выросшие через 12-14 дней на селективной среде клоны проверяли методом ELISA на продукцию антител искомой специфичности. На этом этапе были отобраны 30 клонов-продуцентов антител к иммунизирующему материалу. Из-за возможных примесей в полученном для иммунизации материале среди нужных клонов могли быть и неспецифические. Поэтому более предметное тестирование проводили с помощью двух методов: 1) конкурентного метода ELISA, используя коммерческую поликлональную кроличью антисыворотку к ФVIII человека (Behring, ФРГ); 2) иммуногистохимического окрашивания (ИГХО) криостатных срезов пуповинной вены человека антителами, содержащимися в культуральных жидкостях гибридных клонов (рис. 1). В результате из 30 клонов-продуцентов антител было отобрано 21 искомый, которые давали положительную реакцию только с фактором VIII в каком-либо из тестов (9 клонов в ELISA, 12 клонов в ИГХО), либо в обоих одновременно (4 клон).

Такой достаточно высокий выход специфических клонов обусловлен, с нашей точки зрения, высокой степенью чистоты выделенного для иммунизации материала, а также его высокой иммуногенностью. Дальнейшая характеристика клонов позволит с их помощью характеризовать нарушения гемостаза при наследственных коагулопатиях на молекулярном уровне, а также проводить дифференциальную диагностику опухолей сосудистой природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Böhling T., Paetau A., Ekblom P., Haltia M. // *Acta Neuropathol.* (Berlin) - 1983. - V. 62. - P. 67-72.
2. Bellinger D.A., Nichols T.S., Read M.S., Reddick B.L., Lamb M.A., Brinkhous K.M., Evatt B.L., Griggs T.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1987. - V. 84. - P. 8100-8104.
3. Zimmerman G.T.S., Ratnoff O.D., Powell A.E. // *J. Clin. Invest.* - 1971. - V. 50. - P. 244-254.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУППО-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Е.И.Дерюгина, Н.И.Дризе, Л.Н.Леменева,

Е.Ю.Садовникова, И.Л.Чертков

Всесоюзный гематологический НЦ МЗ СССР, Москва

Поликлональные сыворотки для определения группоспецифических антигенов эритроцитов человека обладают рядом недостатков, затрудняющих их производство и использование. В первую очередь, это относится к собственно поликлональности реагентов, следствием которой является наличие в них нежелательных специфичностей, таких, например, как полиагглютинины в АВО сыворотках [4] или анти-М(N) антитела в исходных анти-Н(M) препаратах [7]. Присутствие в группоспецифических реагентах антител с посторонней специфичностью делает необходимым проведение либо тщательного подбора доноров, что снижает объем выпускаемых серий сывороток, либо - интенсивных абсорбций препаратов, что приводит к существенному уменьшению в них титра группоспецифических антител. Как следствие, недостатками поликлональных типизирующих реагентов являются низкие титры, а зачастую и качество присутствующих в них антител. Кроме того, ограниченность источников сывороток делает неизбежным выпуск реагентов малыми сериями и приводит к нестандартности препаратов.

Всех вышеперечисленных недостатков лишены реагенты, создаваемые на основе моноклональных антител (МКА), направленных к группоспецифическим антигенам эритроцитов человека. В сравнении с поликлональными, моноклональные типизирующие реагенты к тому же обладают рядом преимуществ, которые делают их незаменимыми как в повседневной серологической практике, так и при исследовании структуры, биосинтеза группоспецифических антигенов, их тканевого распределения в норме и при патологических изменениях [5,6].

В работе представлены данные о получении МКА, направленных к группоспецифическим антигенам эритроцитов человека, на основе которых созданы моноклональные типизирующие реагенты для определения АВН и MN антигенов.

Материалы и методы

Гибридомы, секретирующие МКА, направленные к группоспецифическим антигенам эритроцитов человека, получали, как описано ранее [1]. Исходное разведение асцитной жидкости в 100-200 раз и последующие двойные разведения при определении титра МКА в реакции агглютинации на плоскости осуществляли в 0,3 М растворе хлорида натрия; за титр реагента принимали последнее разведение, при котором крупные агглютинаты начинали образовываться не позднее 30 сек. Двойные разведения моно- и поликлональных реагентов при определении титра антител в реакции агглютинации в солевой среде осуществляли в 96-ячеечных микроплатах физиологическим (0,15 М) раствором хлорида натрия; за титр принимали последнее разведение, при котором наблюдалась положительная реакция агглютинации. Авидность реагентов оценивали по трем параметрам реакции агглютинации на плоскости: 1 - время появления первых агглютинатов, 2 - время наступления четкой реакции агглютинации, 3 - время появления крупных агглютинатов. Реакцию абсорбции антител слюной и ферментативную обработку эритроцитов осуществляли стандартными методами [2,3,7]. Использовали гетероиммунные кроличьи анти-М, N и козы анти-Н сыворотки производства ЛенНИИВС и АВО изогем-агглютинирующие сыворотки.

Результаты и обсуждение

Гибридомы, секретирующие МКА против антигенов эритроцитов человека, получали после иммунизации мышей либо групповыми (А или В) веществами, либо эритроцитами соответствующего фенотипа. Наиболее сильным иммуногеном оказались эритроциты, несущие слабый А (A_x) антиген: в этом случае 100 % ячеек с ростом гибридных клеток содержало антитела, вызывающие агглютинацию эритроцитов любой группы, т.е. направленные к "общим" (public) антигенам эритроцитов. В то же время, ни в одном из слияний, проведенных после иммунизации как эритроцитами этого фенотипа, так и групповыми А или В веществами, несмотря на высокую эффективность гибридизации не было получено ни одной гибридомы, секретирующей группоспецифические анти-А или анти-В антитела. При использовании в качестве иммуногенов

эритроцитов, несущих сильные варианты антигенов, в среднем в 15 % ячеек, содержащих гибридные клетки, присутствовали МКА, агглютинирующие эритроциты человека. Из последних лишь около 10 % содержали антитела, направленные к группоспецифическим антигенам эритроцитов.

Отбор МКА, пригодных для создания типизирующих реагентов, проводили на основе сравнительного изучения гемагглютинирующей способности (титра и avidности) МКА и антител поликлональных сывороток. Моноклональные типизирующие реагенты, полученные путем разведения асцитной жидкости в 100-200 раз 0,3 М раствором хлорида натрия, характеризуются высокими титрами (1:32-1:128) и avidностью (средние параметры реакции агглютинации на плоскости составляют 1-2-3 сек) МКА, что значительно превышает таковые для аналогичных поликлональных типизирующих реагентов (средние титры 1:2-1:4, avidность: 5-10-15 сек). Разведение асцитной жидкости в 100-200 раз исключает неспецифическую агглютинацию эритроцитов за счет низкого содержания высокомолекулярных соединений, а отсутствие антител с посторонними специфичностями исключает полиагглютинацию эритроцитов с обнаженными холодовыми антигенами.

Группоспецифические анти-А и анти-В гибридомы отбирали не только по титру и avidности секретируемых ими МКА, но и по способности последних реагировать как с сильными, так и со слабыми формами А или В антигенов. В результате тщательного скрининга среди более чем 140 анти-А и 10 анти-В гибридом лишь одна анти-А и две анти-В клеточные линии, с одной стороны, секретировали МКА, удовлетворяющие серологическим требованиям, а с другой - сами удовлетворяли предъявляемым к производственным штаммам требованиям, а именно 5 обладали достаточно стабильной секрецией антител в высоком титре, а также способностью к росту как в культуре, так и в виде асцитной опухоли у мышей. Сравнение гемагглютинирующей способности полученных анти-А и анти-В антител с АВО типизирующими препаратами при выявлении слабых форм А и В антигенов показало, что созданные моноклональные реагенты (Моноклоны) не уступают лучшим коммерческим реактивам фирм Biotest (ФРГ) и CellTech (Великобритания) (100 % выявления А антигена) и превосходят аналогичные препараты фирм CNTS и CRTS (Франция) (63 % и 86 %

выявления А антигена, соответственно), а также изоиммунные (Финляндия) и изогемагглютинирующие (СССР) типизирующие сыворотки (82 % и 21 % выявления А антигена). В отличие от последних и, кроме того, от большинства зарубежных МКА, полученные анти-А и анти-В МКА обладают способностью преципитировать растворимые формы А и В антигенов, что важно для судебно-медицинских целей.

В связи с недоступностью Н-дефицитных эритроцитов, анти-Н МКА отбирали по способности абсорбироваться Н веществом слюны лиц-выделителей (Ose/-), а также по снижению титра в реакции агглютинации в солевой среде в соответствии с уменьшением содержания Н антигена на эритроцитах в ряду фенотипов: O-A₂-A₂B-B-A₁-A₁B [2]. В результате, были отобраны две анти-Н гибридомы, секретирующие анти-Н антитела, агглютинирующие эритроциты любой группы, и направленные, по-видимому, к разным детерминантам Н антигена или к Н цепям разных типов, что проявляется в различной гемагглютинирующей способности этих антител по отношению к эритроцитам разных фенотипов и по способности абсорбироваться или не абсорбироваться Н веществом слюны.

Моноклональный анти-М реагент, созданный на основе полученных анти-М антител, в отличие от поликлональных гетероиммунных сывороток обладает высокой специфичностью, содержит МКА в высоком титре, что повышает надежность выявления М антигена. Отсутствие в стране панели эритроцитов с редкими формами М антигена делает пока невозможным проведение сравнительного исследования гемагглютинирующей способности моно- и поликлональных реагентов в реакциях с эритроцитами различных М фенотипов. В отличие от поликлональных и зарубежных моноклональных анти-М реагентов [3,7], полученные анти-М МКА направлены к детерминанте, чувствительной к действию химотрипсина: обработанные этим ферментом М эритроциты, сохраняющие способность агглютинироваться поликлональными сыворотками, не агглютинируются полученными анти-М МКА.

Все созданные моноклональные типизирующие реагенты высокоспецифичны и не вызывают реакции агглютинации с эритроцитами, не несущими соответствующий антиген. Исключение составляет анти-Н реагент, агглютинирующий не только Н, но и М эритроциты,

хотя титр по отношению к последним в 4-8 раз ниже, чем к эритроцитам, несущим только N антиген. Подобная перекрестная активность связана с тем, что анти-N антитела направлены к общей детерминанте гликофорина A^N, определяющего N фенотип эритроцитов, и гликофорина B, присутствующего на эритроцитах любой группы (за исключением редчайших фенотипов, обусловленных отсутствием этого типа гликофорина). Это подтверждается обработкой эритроцитов химотрипсином, специфически разрушающим гликофорин B и сохраняющим иммунореактивность гликофорина A. После такой обработки, эритроциты M фенотипа теряют способность агглютинироваться полученными анти-N антителами. За счет разницы в титре анти-N антител по отношению к эритроцитам N и M фенотипов можно подобрать такое разведение асцитной жидкости, при котором анти-N реагент будет обладать условной специфичностью, т.е. не будет реагировать с M эритроцитами в реакции агглютинации в солевой среде и не будет давать четкой реакции агглютинации на плоскости в течение 2-х минут и более с эритроцитами, несущими M антиген.

Таким образом, полученные к группоспецифическим антигенам эритроцитов МКА обладают рядом преимуществ, которые позволяют использовать их для создания современных типизирующих реагентов способных заменить поликлональные сыворотки. В отличие от последних, источник МКА не ограничен, что дает возможность производить типизирующие реагенты большими сериями. Секретируемые гибридами антитела моноклональны, что позволяет получать стандартные реагенты, качество антител в которых неизменно и не варьирует от серии к серии. Производство таких реагентов не требует их тестирования на присутствие антител с посторонней специфичностью, а высокое разведение асцитной жидкости делает ненужной процедуру очистки МКА от высокомолекулярных примесей и исключает неспецифическую агглютинацию эритроцитов. Высокая надежность выявления антигенов эритроцитов, особенно в случае их слабых форм, биологическая безопасность, сокращение времени постановки и наблюдения реакции агглютинации, облегчение работы персонала при типировании групп крови - все это делает промышленное производство моноклональных реагентов для определения антигенов эритроцитов различных систем не только перспективным, но и настоятельно необходимым.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дерюгина Е.И., Дризе Н.И., Леменева Л.Н., Удалов Г.А., Чертков И.Л. // Биотехнология. - 1988. - Т. 4. - С. 108-113.
2. Doinel C., Edelman L., Rouger Ph. et al. // Immunology. - 1983. - V. 50. - P. 215-221.
3. Fraser R.H., Munro A.C., Williamson A.R. et al. // J. Immunogenet. - 1982. - V. 9. - P. 295-301.
4. Judd W.J. // Labmedica. - 1985/1986. - V. 11. - P. 23-28.
5. Oriol R. // Transplant. Proc. - 1987. - V. 19. - P. 4416-4420.
6. Parsons S.F. // Med. Lab. Sci. - 1985. - V. 42. - P. 361-366.
7. Rubocki K., Milgrom F. // Vox Sang. - 1986. - V. 51. - P. 217-225.

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЛЕНОЦИТОВ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ЭРИТРОЦИТАРНЫХ АНТИГЕННЫХ ФАКТОРОВ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Е.С.Завольная, А.М.Машуров, Э.С.Морозова,
Т.П.Швецова, В.И.Черкащенко

Институт цитологии АН СССР, Ленинград; Институт
эволюционной морфологии и экологии животных АН СССР
им. А.Н.Северцова, Москва; Институт общей генетики
АН СССР, Москва

В соответствии с методикой получения гибридом, как правило, в опыте используется не более 100 млн спленоцитов, что составляет менее половины количества клеток селезенки самки мыши BALB/c [1]. Несмотря на очевидную целесообразность сохранения и дальнейшего использования оставшихся клеток, этому разделу технологии не уделялось внимания. Вместе с тем известно, что вследствие воздействия сверхнизкими температурами состав популяции селезеночных клеток меняется, и преимущественно погибает В-лимфоцитарная фракция [5].

Известно также, что количественные соотношения спленоци-

тов и миеломы или непосредственно количество спленоцитов, использованных на разных этапах процесса получения гибридом, играет существенную роль в конечном итоге эксперимента [7]. Поэтому с точки зрения совершенствования гибридомной технологии представляется важным оценить как количественную убыль спленоцитов после криоконсервации, так и качественную их полноценность в составе гибридомы.

В данной работе в процессе получения моноклональных антител (МКА) к эритроцитарным антигенам крупного рогатого скота (КРС) и овец исследована возможность формирования гибридом на основе спленоцитов, сохранявшихся при -196°C в течение четырехсуточного или почти двухлетнего периода.

Материалы и методы

Спленициты получали от двух независимо иммунизированных партий мышей BALB/c. Первую партию иммунизировали внутривенно-внутрибрюшинно тремя инъекциями эритроцитов КРС по схеме Е. Такер [6]. Во втором опыте при повторной инъекции эритроциты КРС заменили эритроцитами свцы. В обоих опытах были использованы селезенки от животных с титром антител в сыворотке крови 1:512-1:1024. Спленициты сливали с клетками миеломы Sp2/0-Ag14 с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) м.в. 1500 с добавлением 10 % ДМСО. Гибриды селектировали на среде ГАТ и культивировали на смеси сред 1:1 RPMI 1640 и DMEM (Flow), обогащенной 10 % эмбриональной сыворотки коров, глутамином, заменимыми аминокислотами, пируватом натрия и 2-меркаптоэтанолом. Подробнее методика получения антиэритроцитарных гибридом описана нами ранее [2]. Суспензию клеток после слияния распределяли в 96-ячеечные платы.

Криоконсервировали спленоциты по трехступенчатой программе с изменением скорости понижения температуры от $+20^{\circ}\text{C}$ до -30°C по $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, от -30°C до -100°C по $10^{\circ}-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, от -100°C до -196°C по $300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ по программе, используемой в криокомплексе ИНЦ АН СССР. Спленициты замораживали в эмбриональной сыворотке коров с 10 % ДМСО по 10 млн клеток в ампуле (1 мл) и хранили в течение 674 дней в первом опыте и 4 суток во втором.

Жизнеспособность клеток после реконсервации определяли

окрашиванием 1 % трипановым синим.

Секрецию антител против эритроцитарных антигенов КРС и овец тестировали по реакции прямой тепловой (36°C) или холодной (23°C) агглютинации или теплового (36°C) и холодого ($18^{\circ}\text{--}23^{\circ}\text{C}$) гемолиза эритроцитов животных-доноров в присутствии комплемента кролика [3]. Специфичность антител к антигенам групп крови устанавливали в результате тестирования на панели эритроцитов от 50-150 животных.

Результаты и обсуждение

В таблице I представлены результаты пяти независимых гибридизаций, проведенных как с интактными (графы I,4), так и с криоконсервированными спленоцитами (графы 2,3,5). Как основным результат следует отметить возможность получения активных клонов после слияния со спленоцитами, пережившими замораживание. При этом эффективность гибридизации, оцениваемая по числу лунок с клонами, в опытах со свежewedенными спленоцитами составляла 100-91 %, но была значительно ниже в случаях, когда для слияний использовали клетки, пережившие замораживание (25,0 %; 27,5 % - в опыте I). Однако при увеличении числа спленоцитов, участвующих в слиянии (при соотношении спленоцитов к миеломным клеткам 14:1 вместо 10-9:1) достигался выход клонов почти равный контрольному (82 %).

Снижение эффективности гибридизации при использовании реконсервированных спленоцитов выявлялось отчетливее при сравнении числа клонов, отнесенных к 10^6 спленоцитов. При использовании интактных клеток на 1 млн возникало 4,2 и 3,9 клон, в то время как из реконсервированных образовывалось в 2-1,5 раза меньше (2,2; 2,0 и 2,6). Еще более резкие различия (в 3-4 раза) наблюдались по числу клонов-продуцентов антител (0,41 и 0,15 в первом опыте и 0,42 и 0,09 - во втором).

Снижение эффективности гибридизации нельзя отнести за счет уменьшения жизнеспособных спленоцитов, выявляемых окрашиванием, поскольку эта доля компенсировалась увеличением взятых в слияние клеток. По-видимому, существенную роль в этом эффекте играют криповреждения, проявляющиеся отдаленно при восстановлении клеточной пролиферативной активности. Такое объяснение согласуется с имеющимися в литературе сведениями.

Таблица I

Влияние предварительной криоконсервации спленоцитов на эффективность получения гибридом

№ опы-та	№ сли-яния	Срок хране-ния сплено-цитов при -196° С, сутки	Доля жи-вых спле-ноцитов, %	Количество клеток в опыте $\times 10^6$		Отношение сплено-цитов к миелом-ным	Количество лунок			% от общего числа лунок		Количество клонов (лунок) на 1 млн сплено-цитов	
				спле-ноци-тов *	мие-ломы		об-щее	с кло-на-ми	с ак-тивны-ми кло-нами **	с с ак-тивными клонами	с с ак-тивными клонами	об-щее	актив-ных
I	1	0	95	61,8	6,02	10:1	286	262	63	91,2	22,0	4,2	0,41
	2	655	72	44,3	4,8	9,4:1	384	96	7	25,0	1,8	2,2	0,15
	3	674	76	57,5	5,9	9,7:1	480	132	0	27,5	0,0	2,0	0,0
II	4	0	97	134,4	9,2	14:1	528	528	55	100	10,4	3,9	0,42
	5	4	82	186,5	13,5	14:1	504	481	18	82	3,5	2,6	0,09

* Учтено только число клеток, определяемых при окрашивании как жизнеспособные.

** Антитела реагируют с эритроцитами донора, но не идентифицированы по группоспецифичности к определенному антигену.

ями о потере лимфоцитами вследствие криоконсервации способности отвечать на митогенную стимуляцию [5]. Относительно природы повреждений, вызывающих снижение гибридизуемости клеток, наиболее вероятной представляется гипотеза усугубления повреждений клеточных мембран лимфоцитов, вызванных охлаждением, последующим действием ПЭГ. Прямые доказательства структурных изменений мембран лимфоцитов человека после глубокого быстрого охлаждения до -196°C и очень медленного их восстановления получены осмометрическими методами [4].

Как видно из суммированных данных таблицы, в результате слияний, проведенных с интактными или с пережившими криоконсервацию спленоцитами, было отселектировано 143 клон, секретирующих МКА к антигенам эритроцитов животного-донора. Из них 55 (данные не приведены в таблице) обнаруживали активность к одному из антигенов КРС или к одному из антигенов, общих для эритроцитов КРС и овец. Из числа активных клонов выделено три производственно значимых штамма гибридом. Два из них (IC8/I8/2 и 4E6/7) секретируют соответственно МКА к V и F антигенным факторам эритроцитов КРС F-системы групп крови. Третий, выделенный в клеточную линию штамм 2EII/8/35, секретирует МКА против антигена общего для КРС и овец и, предположительно, не идентифицированного ранее в пределах нашей страны.

Выводы

1. Спленициты мышей самок BALB/c, иммунизированных эритроцитами КРС (или КРС-овец) после хранения при -196°C в течение сроков от четырех суток до двух лет пригодны для получения гибридом - продуцентов МКА к факторам групп крови этих животных.
2. Для получения сопоставимых по эффективности гибридизации результатов при использовании спленоцитов свежевыделенных и переживших криоконсервацию количество последних в слияниях должно быть увеличено по сравнению с количеством интактных клеток в аналогичных опытах в 1,5 и более раз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кеннет Р.Г., Мак-Керн Т.Дж., Бехтол К.Б. // Моноклональные антитела. Гибридомы: новый уровень биотехнологическо-

- го анализа. - М.: Медицина, 1983. - 416 с.
2. А.с. I38930I СССР, 5I(4) C I2 P I/00, Штамм гибридных культивируемых клеток *Mus musculus* - продуцент моноклональных антител против эритроцитарного антигенного фактора Вв свиней / Е.С.Завольная, Т.Н.Игнатова, И.В.Кожухарова, А.Г.Паншин, Г.Н.Сердюк, Л.В.Смагина (СССР) - № 397880I/3I-I3; Заявлено 18.II.85.
 3. Тихонов В.Н./Использование групп крови при селекции животных (с основами иммуногенетики). - М.: Колос, 1967. - 390 с.
 4. McGann L., Walterson M. // *Cryobiology*. - 1987. - V. 24. - No. 6. - P. 560-561.
 5. Taylor M.J., Bank H.L. // *Cryobiology*. - 1988. - V. 25. - No. 1. - P. 1-18.
 6. Tucker E.M., Wright L.J., Varden S.E. // *Immunol. Lett.* - 1981. - V. 3. - No. 1. - P. 121-123.
 7. Westerwoudt R.J., Naipal A.M., Harrison C.M.H. // *J. Immunol. Meth.* - 1984. - V. 68. - No. 1. - P. 89-101.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К АНТИГЕНАМ КЛЕТОК HL-60 И ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АНТИГЕНОВ В ХОДЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

С.О.Ингерпуу, А.Э.Сюнтер, А.О.Пийрсоо, А.Н.Пихлак
НИИ общей и молекулярной патологии Тартуского государственного университета

Моноклональные антитела (МКА) к антигенам клеток миелоидно-моноцитарного ряда применяют в диагностике миелоидных лейкозов и для изучения процесса дифференцировки клеток этого ряда. Для изучения экспрессии дифференцировочных антигенов миелоидного ряда используют МКА, имеющие специфичность к антигенам различных кровяных клеток. В качестве модели дифференцировки довольно часто используются клеточные линии HL-60, THP-1, K-562, U-937, KG-1 и др., имеющие чувствительность к различным индукторам дифференцировки [5,2,8,9].

Клеточную линию HL-60 можно индуцировать в направлении полиморфонуклеаров (диметил-сульфоксидом, ретиновой кислотой, диметилформамидом и др.) [3,5,6,4] и в направлении моно-

цитов-макрофагов (витамином D₃, форболовым эфиром, интерфероном и др.) [1,7,9].

В настоящей работе для исследования использовали четыре МКА к поверхностным антигенам гранулоцитов человека, обозначенных нами как IGR.

Целью данной работы являлось изучение на клетках промиелоцитоидной линии HL-60 экспрессии антигенов, соответствующих МКА IGR. Дифференцировку клеток HL-60 индуцировали в направлении моноцитов-макрофагов форболовым эфиром (TPA).

Материалы и методика

Гибридомные линии IGR-I и IGR-2 получили путем слияния лимфоцитов селезенки иммунизированных мышей BALB/c и клеток мышиных миелом РА1 и Sp2/0, соответственно. Мышей иммунизировали гранулоцитами человека 4 раза внутрибрюшинно с расчетом 20-40 млн клеток на одного животного. Гранулоциты выделяли из периферической крови человека, используя двухступенчатый градиент фиколл-верографина. Слияние клеток проводили с помощью 50 %-ного раствора полиэтиленгликоля фирмы Merck с молекулярной массой 4000 Д в забуференном физиологическом растворе (ЗФР). Клетки выращивали в питательной среде DMEM или RPMI 1640 с добавлением ГАТ и фетальной сыворотки крупного рогатого скота (10-15 %).

Клетки линии HL-60 индуцировали к дифференцировке с помощью 12-0-тетрадеканоилфорбол-13-ацетата (TPA, фирмы Sigma) в концентрации 10 нг/мл. Исходная концентрация клеток при индукции была $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Клетки HL-60 выращивали в питательной среде ISCOVE с добавлением фетальной сыворотки крупного рогатого скота (10 %).

Клетки выращивали в отдельных сосудах 2, 4 и 6 дней с индуктором TPA. Смена питательной среды была проведена на четвертый (I опыт) и на второй и четвертый день (II опыт) от начала индукции. Концентрация индуктора при смене питательной среды была сохранена.

Анализируемые клетки, выделенные из питательной среды, отмывали трижды ЗФР. Затем клетки фиксировали в 2 %-ном параформальдегиде в 0,09 М фосфатном буфере 5 мин при 4° С. После отмывания клетки инкубировали в суспензии с МКА в разведении

1:100 в ЗФР в течение ночи при 4° С. После этого клетки отмывали 4 раза в ЗФР и инкубировали в растворе вторичных антител (кроличьи антитела к иммуноглобулинам IgG или IgM мыши, конъюгированные с ФИТЦ-ом, в разведении 1:30).

Для анализа клеточного цикла в качестве маркера ДНК использовали бромид этидия в концентрации 20 мкг/мл в ЗФР. Перед анализом клетки обрабатывали РНКазой (10 мкг/мл).

Анализ был проведен с помощью флуоресцентного сортировщика клеток (АТС-3000, фирмы BRUKER-ODAM) аргонным лазером (IIA120-I). Флуоресценцию измеряли при длине волны 488 нм. Анализ данных проводили по иммунопрограмме фирмы BRUKER-ODAM.

Результаты и обсуждение

Моноклональные антитела IGR-I 586.6; IGR-I 4C7.3; IGR-I 5G7.1 и IGR-2 1A6.2 использовали для исследования экспрессии соответствующих им антигенов в ходе дифференцировки клеточной линии HL-60 в присутствии индуктора ТРА.

Проведенные ранее иммунофлуоресцентный анализ на мазках гранулоцитов человека и клеток лейкозной линии HL-60, а также ультраструктурный анализ с использованием в качестве маркера коллоидного золота показали, что названные антитела имеют специфичность к антигенам, локализующимся на поверхности клеток и в цитоплазме окооядерной зоны.

Индукцированная дифференцировка клеточной линии HL-60 выявила изменения в уровне экспрессии исследуемых антигенов на поверхности клеток, а также в количестве клеток, носящих этот антиген при прохождении клетками процесса дифференцировки.

Наиболее точное представление об экспрессии антигенов на клеточной поверхности дает показатель средней интенсивности флуоресценции положительных клеток (обозн. mean +), при котором исключена неспецифическая флуоресценция.

Изменения в степени экспрессии антигенов при индукции сопровождались изменениями в морфологических показателях клеток (размеры, гранулярность) и в прохождении клеточного цикла.

Опыты № 1 и № 2 в общих чертах совпадают по изменениям в экспрессии всех четырех антигенов на поверхности клеток и по изменениям количества положительных клеток в популяции во время индукции (рис. 1, А-Г).

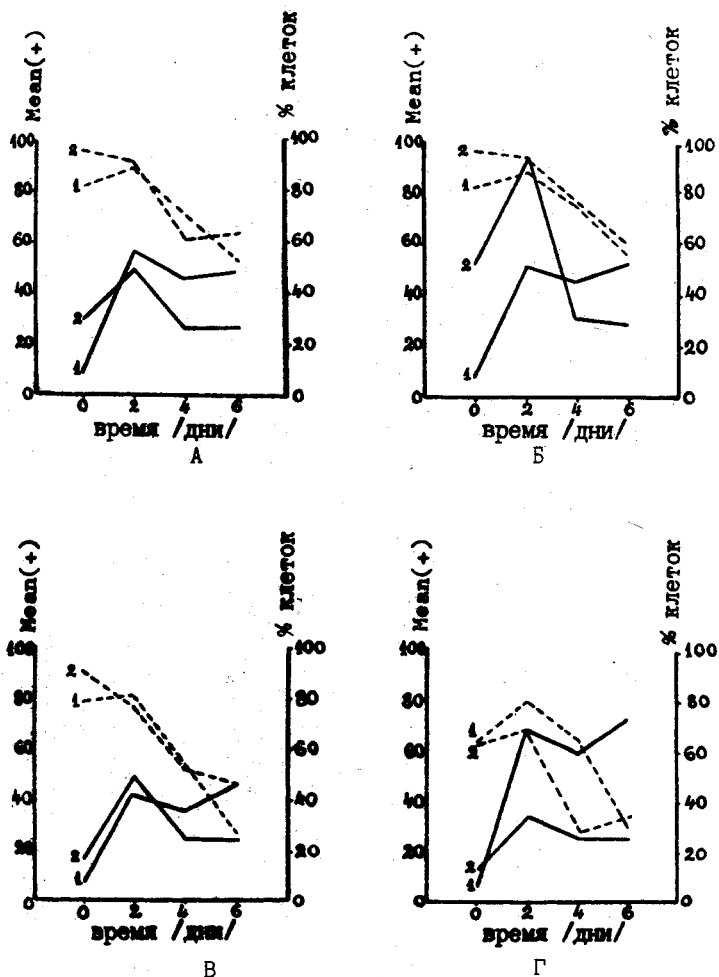


Рис. 1. Индукция клеток HL-60 с ТРА. Средняя интенсивность флуоресценции положительных клеток (----) и процент положительных клеток в популяции (—). 1 - первый опыт; 2 - второй опыт.

А - МКА IGR-I 5B6.6; Б - МКА IGR-I 4C7.3;

В - МКА IGR-2 1A6.2; Г - МКА IGR-I 5G7.1.

В ходе индуцированной дифференцировки на поверхности клеток HL-60 происходит многократное увеличение (в 2-6 раз) антигенов, специфически реагирующих с МКА IGR-I 5B6.6; IGR-I 4C7.3; IGR-I 5G7.I и IGR-2 IA6.2. Экспрессия антигенов достигает максимума ко второму дню индукции.

Следует отметить, что в первом опыте со второго дня индукции среднее количество изученных антигенов на поверхности клеток изменяется незначительно, но во втором - сокращается на четвертый день, оставаясь затем неизменным. После второго дня индукции общее число положительных клеток в популяции резко сокращается в обоих опытах (рис. I). На поверхности индуцированных клеток HL-60 наблюдается наибольшая экспрессия антигена, соответствующего МКА IGR-I 4C7.3 (рис. IB). Различия в степени экспрессии антигенов в двух опытах (особенно после четвертого и шестого дня индукции) обусловлены условиями эксперимента (неодинаковый режим смены питательной среды).

Изучение клеточного цикла клеток HL-60 при индукции ТРА показало изменение в нормальном распределении количества ДНК в клеточной популяции уже на второй день индукции. Нами предполагается, что такое резкое изменение в содержании ДНК клеточной популяции объясняется наличием полиплоидизации индуцированных клеток.

Обобщая, можно заключить, что под влиянием индуктора ТРА на клеточную линию HL-60 изменяется экспрессия всех антигенов, соответствующих МКА типа IGR на поверхности клеток, а также - количество положительных клеток в изученной популяции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ball E.D. et al. // Exp. Nematol. - 1986. - V. 14. - P. 998-1005.
2. Breitman T.R. et al. // N.Y.: Alan R. Liss, Inc. - 1984 - P. 215-236.
3. Collins S.J. // The J. Am. Soc. Nematol. - 1987. - V. 70. - No. 5. - P. 1233-1244.
4. Farace F. et al. // Eur. J. Immunob. - 1986. - V. 16. - P. 1521-1526.
5. Fisher A.G. et al. // Clin. Exp. Immunob. - 1982. - V. 50. - P. 374-381.

6. Mukherjee A.B. et al. // Cytobios. - 1985. - V. 44. - P. 109-118.
7. Murao S. et al. // Canc. Res. - 1983. - V. 43. - P. 4989-4996.
8. Yen A. // Experim. Cell Res. - 1985. - V. 156. - P. 198-212.
9. Yun K. et al. // Lab. Investigation. - 1986. - V. 54. - P. 336-344.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ЛИМФОЦИТАМ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА

Н.Н.Куценко, А.Ю.Волгин, О.Э.Зайкина

ВНИИ разведения и генетики сельскохозяйственных животных, Ленинград; Институт медицинской генетики АМН СССР, Москва

Целью настоящего исследования явилось получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКА) к поверхностным антигенам лимфоцитов крупного рогатого скота (КРС).

Для получения гибридом использовали клетки миеломы P3.X63.Ag8.653, находящейся в логарифмической фазе роста. До момента гибридизации клетки миеломы культивировали в течение месяца на среде, содержащей 8-азагуанин (30 мкг/мл) для удаления ревертантных и мутантных клеток, не имеющих дефекта по ферменту ГТФРТ.

Сенсибилизированные антигеном лимфоциты выделяли из селезенок мышей линии BALB/c δ , иммунизированных лимфоцитами периферической крови КРС, которые выделялись на градиенте Веро-графин/Фиколла (уд. пл. 1,077).

Иммунизацию животных проводили по двум схемам. В первом случае антиген вводили трижды внутрибрюшинно в дозе 2×10^7 клеток/мышь с 10-дневным интервалом. Во втором - последнюю иммунизацию проводили внутриселезеночно в той же дозе клеток. В случае внутриселезеночного введения антигена было получено в 2 раза большее количество клонов-продуцентов антител.

Слияние клеток проводили на 3-4 день после последней иммунизации с помощью полиэтиленгликоля (мол. вес 1500, Merck).

Соотношение клеток миеломы и иммунных спленоцитов составляло 1:10. В качестве питательной среды использовали среду DMEM (Gibco) с добавлением 15 % фетальной сыворотки (Flow Lab.) и 80 ЕД гентамицина (Farmachim). Питающим слоем служили сингенные перитонеальные макрофаги. Тестирование надосадочной жидкости на наличие антител проводили начиная с 7 дня после гибридизации с помощью комплементзависимого микролимфоцитотоксического теста (ЦТТ). Клонирование и реклонирование полученных гибридом осуществляли методом лимитирующих разведений.

Две из полученных 40 гибридом (условное обозначение - А5 и Е3) были трижды клонированы и переведены в асцит мышам F₁ (BALB/c x СНК (беспородные)). Мышам за 14 дней вводили по 0,5 мл пристана (Gibco).

Полученная асцитическая жидкость содержала МКА в титре 1:20000-1:30000. Гибридомы А5 и Е3 синтезировали МКА, относящиеся к IgG классу. Для определения специфичности полученных МКА были проведены дополнительные исследования с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), иммунофлуоресценции, ЦТТ, РГА.

При изучении видовой специфичности МКА ставили ИФА на лимфоцитах КРС, свиньи, человека и В-лимфобластоидных клетках человека. Клетки фиксировали к пластику с помощью ФГА (1 мкг/лунку) и глutarового альдегида (0,2 %). Результаты экспериментов представлены в таблице.

МКА	А5	Е3
Лимфоциты КРС	++++	++++
Лимфоциты свиньи	-	-
Лимфоциты человека	+-	+
В-лимфобласты человека	+-	+

++++ - ОЕ = 2,5-1,5 в разведении до 1:2500

+ - ОЕ = 1,2-0,5 в разведении до 1:500

+- - ОЕ = 1,0-0,5 в разведении до 1:250

- - ОЕ = 1,0-0,5 в разведении до 1:8

Из данных таблицы следует, что МКА хорошо реагируют с лимфоцитами КРС, практически не реагируют с лимфоцитами

свиньи и демонстрируют некоторую перекрестную активность с лимфоцитами и В-лимфобластоидными клетками человека, причем МКА ЕЗ обладают этой способностью в большей степени.

МКА А5 и ЕЗ при постановке РГА не реагировали с эритроцитами КРС, свиньи, барана, человека.

Для решения вопроса - распознают ли МКА мономорфные детерминанты, т.е. антигенные детерминанты, имеющиеся на всех лимфоцитах у всех животных, или они распознают полиморфные детерминанты - т.е. имеющиеся у некоторых представителей крупного рогатого скота, были проведены следующие эксперименты.

МКА А5 и ЕЗ тестировали в реакции непрямой иммуофлуоресценции на свежевыделенных лимфоцитах КРС. Из 25 доноров МКА А5 реагировали с 20 и не давали реакции с 5 образцами лимфоцитов, соответственно МКА ЕЗ реагировали с 21 и не давали реакции с 4 образцами. Эти данные позволяют говорить о том, что полученные МКА реагируют с полиморфной детерминантой, находящейся на поверхности лимфоцитов КРС.

В другой серии исследований, для установления более точной специфичности антител, определяли с помощью ЦТТ взаимодействие МКА с лимфоцитами периферической крови от 35 животных с известным фенотипом по антигенам гистосовместимости (система *ВОLA* - I класс антигенов). Животные были типированы по 17 антигенам, из них в данной группе животных было идентифицировано 9 антигенов.

МКА А5 реагировали с лимфоцитами следующим образом: 1) с лимфоцитами от 21 животного МКА А5 давали реакцию в титре 1:16000-1:32000; 2) с лимфоцитами 10 животных титр антител оставался тем же, но отмечался феномен прозоны от разведения 1:4 до 1:1000; 3) с лимфоцитами 4 животных реакция отсутствовала.

МКА ЕЗ реагировали аналогичным образом: 1) сильная реакция без прозоны - 3 животных; 2) сильная реакция с прозоной - 12, слабая реакция (титр 1:500, 1:1000) без прозоны - 5; 3) слабая реакция с прозоной - 10; 4) отсутствие реакции - 7 животных.

Наличие феномена прозоны можно объяснить тем, что в условиях относительного избытка антител и небольшого количества антигенов на клеточной мембране комплемент связывался со сво-

бодными антителами инкубационной среды. Увеличение количества комплемента в 2 раза отменяло эффект прозоны.

При статистической обработке данных, направленной на установление точной специфичности МКА оказалось, что наличие высокой гомозиготности животных, а также неполная панель типизирующих сывороток не позволяют дать точный ответ - выявляют ли МКА А5 и Е3 антигены системы ВОЛА, и если да, то какие именно.

Дальнейшие исследования с использованием большего числа животных с известным и разнообразным фенотипом позволят более точно установить антигенные детерминанты, к которым направлены полученные антитела.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К АНТИГЕНАМ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ И ПАП-НАБОР МОНОКЛОНАЛЬНЫЙ. ХАРАКТЕРИСТИКА, ПРИМЕНЕНИЕ

В.В.Новиков, М.Н.Трофимова, А.Ю.Барышников, А.В.Червонский
НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РСФСР, Горький

Разработан ряд диагностических препаратов моноклональных антител (МКА) для выделения антигенов клеток иммунной системы человека. Антитела применимы для иммунодиагностики гемобластозов и оценки состояния иммунитета.

МКА ИКО-I направлены к неполиморфной части антигенов II класса системы гистосовместимости (Ia-подобным антигенам), относятся к третьему подклассу мышиных иммуноглобулинов G, выявляют белковый гетеродимер с молекулярной массой 29 и 34 кД, блокируют реакцию на аллоантигены в смешанной культуре лимфоцитов, цитотоксичны, взаимодействуют с клетками крови и костного мозга больных различными формами лейкозов, а также с моноцитами, В-лимфоцитами и активированными фитогемагглютинином Т-лимфоцитами [1].

МКА ИКО-ГМ-I взаимодействуют с бета-цепью, общей для CR-3 рецептора и LFA-1 антигена, относятся к 2а-подклассу мышиных иммуноглобулинов G, выявляют в иммуноблоттинге полипептид с молекулярной массой 95 кД, блокируют взаимодействие инактивированного компонента комплемента с CR-3 рецептором, блокиру-

ют НК-клеточную активность, цитотоксичны, взаимодействуют с клетками крови и костного мозга больных различными формами лейкозов, а также с гранулоцитами, моноцитами и Т-лимфоцитами периферической крови здоровых лиц [3].

МКА ИКО-Г-2 взаимодействуют с х-гаптенем (лакто-N-фукопентаоза III), ярко экспрессированном на гранулоцитарных клетках и менее выраженном на моноцитах, относятся к 2а-подклассу мышиных иммуноглобулинов G, цитотоксичны, взаимодействуют с клетками крови больных нелимфоидными формами лейкозов [5].

МКА ИКО-II взаимодействуют с альфа-цепью LFA-1 антигена, относятся к третьему подклассу мышиных иммуноглобулинов G, выявляют в иммуноблоттинге полипептид с молекулярной массой 180 кД, цитотоксичны, взаимодействуют с частью мононуклеарных клеток периферической крови здоровых лиц, тимоцитами, НК-клетками, подавляют активность НК-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов, индуцированных в смешанной культуре лимфоцитов, блокируют Е-розеткообразование и реакцию бласттрансформации лимфоцитов на фитогемагглютинин. Гетерогенно взаимодействуют с клетками больных различными формами острых лимфолейкозов; при острых нелимфоцитарных лейкозах преимущественно взаимодействуют с клетками, имеющими моноцитоподобную направленность дифференцировки [2].

Рассмотрены вопросы технологии получения препаратов МКА. Предложена схема наработки препаративных количеств МКА в асцитной форме, применимая для производственных условий и включающая в себя следующие этапы: а) обработка мышей линии BALB/c стимулятором асцитобразования, основанном на вазелиновом масле (неполный адъювант Фрейнда или вазелиновое масло + 3 % пептона); б) введение в объеме 3 мл гибридных клеток, полученных от предыдущего пассажа в ранние сроки формирования асцита [8,10].

Данная схема обеспечивает высокую частоту формирования асцитных опухолей и приводит к получению МКА в тех же или даже больших количествах, чем при использовании пристана. Выявлено, что количество получаемых МКА не зависит от пола животных, служащих реципиентами гибридных клеток.

Изучена возможность применения беспородных лабораторных мышей для наработки асцитных МКА. Показано, что беспородные

животные, обработанные стимулятором асцитобразования и получившие затем дозу облучения, равную 600 рад, способны служить реципиентами гибридных клеток, обеспечивая наработку моноклональных антител в количествах, сравнимых с продукцией антител мышами линии BALB/c. Тем не менее, пассивирование гибридом на облученных беспородных мышах быстро приводит к гибели клеток, что ограничивает применение беспородных животных.

Опробованы различные методы очистки МКА из асцитической жидкости мышей. Были использованы сульфатный, риванольный, каприлатный методы, очистка с помощью ПЭГ. Во всех случаях антитела были загрязнены примесными белками. Электрофоретически чистые МКА удалось получить при использовании сорбентов, несущих белок А золотистого стафилококка: белок А-сефарозы ("Фармация", Швеция); белок А-агарозы, полученной иммобилизацией белка А (НПО "Восток"); на активированной бромцианом агарозе (Институт химии АН ЭССР); стафилококкового реагента, содержащего белок А (ЛенНИИМ им. Пастера) [7,9].

Исследовано влияние различных стабилизирующих добавок на сроки хранения сухих и жидких препаратов МКА. Показано, что природа стабилизатора не оказывает существенного влияния на сроки хранения препаратов, в то же время они в значительной степени зависят от принадлежности МКА к тому или иному изотипу. Среди МКА, относящихся к IgG мыши, наиболее стабильны МКА 2а-изотипа, наименьшие сроки хранения имеют МКА третьего подкласса.

На основе полученных ранее МКА к пероксидазе хрена [III], разработан ПАП-набор (пероксидаза - антипероксидаза) для иммуноферментных реакций с помощью МКА. В состав набора вошли: преформированный ПАП-комплекс (МКА к пероксидазе хрена + пероксидаза хрена); козьи антитела к иммуноглобулинам мыши, используемые как связующие антитела; и нормальные сывороточные иммуноглобулины мыши, применяемые в качестве отрицательного контроля взамен МКА.

При конструировании ПАП-набора проведен анализ количественных соотношений между пероксидазой и МКА к пероксидазе в составе ПАП-комплекса, а также соотношений между ПАП-комплексом и связующими антителами [6]. Обнаружено, что существует сравнительно узкий диапазон концентраций пероксидазы, обеспе-

чивающий максимальную интенсивность реакции. Этот диапазон зависит от концентрации связующих антител, используемых при постановке ПАП-реакции, и не зависит от содержания в составе ПАП-комплекса МКА к пероксидазе. В то же время, интенсивность реакции имеет выраженную зависимость от активности используемой пероксидазы и от содержания в составе ПАП-комплекса МКА к пероксидазе.

Показано, что в твердофазном иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител различной специфичности ПАП-набор может быть использован вместо антимишанных пероксидазных конъюгатов. Так, в комплексе с МКА к Hbs-антигену [4] ПАП-набор обеспечивает выявление Hbs-антигена в концентрации 1-2,5 нг/мл. Кроме того, ПАП-набор может быть использован в иммуногистохимии и в иммуноблоттинге с применением МКА различной специфичности [12].

Недостатком ПАП-метода является его многостадийность. В связи с этим была исследована возможность совместного нанесения связующих антител и ПАП-комплекса при постановке твердофазного варианта иммуноферментного анализа. Определены оптимальные количественные соотношения связующих антител и ПАП-комплекса, показавшие необходимость использования многократного избытка раствора ПАП-комплекса. Чувствительность "ускоренного" метода, оцененная с применением МКА к Hbs-антигену, также соответствовала 1-2,5 нг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барышников А.Ю., Блохина Н.Г., Кадагидзе З.Г. и др. // Эксперим. онкология. - 1987. - № 6. - С. 45-48.
2. Барышников А.Ю., Дубинкин И.В., Савельева Е.В. и др. // Булл. эксп. биол. мед. - 1988. - № 1. - С. 55-58.
3. Барышников А.Ю., Дубинкин И.В., Савельева Е.В. и др. // Иммунология. - 1987. - № 5. - С. 78-81.
4. Воробьев С.М., Симонов В.И., Куц А.А. и др. // Биотехнология. - 1987. - № 6. - С. 720-724.
5. Крыжанов М.А., Барышников А.Ю., Тупицын Н.Н. и др. // Булл. эксп. биол. мед. - 1987. - № 7. - С. 75-77.
6. Новиков В.В., Андреев А.В., Червонский А.В., Фаерман А.И.

- // Биохимия и биофизика микроорганизмов. Горький, 1987. - С. 42-48.
7. Новиков В.В., Трофимова М.Н., Андреев А.В., Сандова О.М. // Лабораторное дело. - 1987. - № 8. - С. 606-610.
 8. Новиков В.В., Трофимова М.Н., Жильцова М.А., Сандова О.М. // Антибиотики и химиотерапия. - 1988. - № 7. - С. 530-532.
 9. Новиков В.В., Трофимова М.Н., Сандова О.М., Андреев А.В. // Новые биотехнологические процессы и биологические препараты. - Горький, 1985. - С. 59-64.
 10. Трофимова М.Н., Новиков В.В., Сандова О.М. и др. // Биотехнология. - 1987. - № 6. - С. 735-737.
 11. Фаерман А.И., Червонский А.В., Чипышева Т.А. и др. // Бюлл. эксп. биол. мед. - 1987. - № 5. - С. 631-634.
 12. Фаерман А.И., Червонский А.В., Новиков В.В. и др. // Структура, биосинтез и функции молекулярных элементов иммунной системы. - Пушино, 1987. - С. 56-59.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К "ТЕТРОДОТОКСИНЧУВСТВИТЕЛЬНОМУ БЕЛКУ" ГОЛОВНОГО МОЗГА - НОВЫЙ В-ЛИМФОЦИТАРНЫЙ МИТОГЕН ?

Г.В.Пинчук, Л.Н.Пинчук, О.В.Герасименко, Ю.В.Герасименко

Институт физиологии им. А.А.Богомольца АН УССР, Киев

Одним из важных аспектов биотехнологии является получение моноклональных антител (МКА), служащих инструментами для решения фундаментальных исследовательских задач. В частности, такими инструментами являются МКА, направленные к специализированным функционально активным белкам клеточной мембраны.

Ранее [3] в нашей лаборатории из водорастворимой фракции мозга быка был выделен белок, который при встраивании в искусственную липидную мембрану приобретал некоторые свойства электроуправляемого натриевого канала нервных клеток. Так, данный белок оказался способным при встраивании в липосомы индуцировать проводимость ионов натрия, которая блокировалась тетродотоксином. Было высказано предположение, что данный "тетродотоксинчувствительный белок" является биосинтетическим предшественником либо продуктом деградации зрелых мембранных

натриевых каналов [3]. Задачей нашей работы было получить МКА к тетродотоксинчувствительному белку и охарактеризовать представительство эпитопов тетродотоксинчувствительного белка в клетках различного происхождения.

Для получения МКА в качестве иммуногена использовали тетродотоксинчувствительный белок, выделенный из геля после завершения препаративной электрофоретической очистки (любезно предоставлен М.К.Малышевой). Гибридомы получали с помощью стандартной методики [5] с небольшими модификациями [1]. Скрининг МКА осуществляли с помощью теста ELISA в микромодификации [8] с использованием фотометра "Морфоквант" и ЭВМ KSR-4100 [2].

Одна из полученных гибридом, ИФБ-4, продуцировала МКА, которые дозозависимо связывались с очищенным тетродотоксинчувствительным белком, а также с эпитопами плазматической мембраны клеток головного мозга и нейроblastомы (рис. 1). Адсорбция МКА ИФБ-4 монослоем культивируемых клеток нейроblastомы угнеталась вератрином - лигандом, специфически модулирующим активность электроуправляемого натриевого канала [4] (рис. 2).

Изучая распределение эпитопа ИФБ-4 среди клеток различного тканевого происхождения, мы обнаружили, что данные МКА дозозависимо связываются с моноклеарными клетками периферической крови и селезенки (рис. 3). Не было обнаружено видоспецифичности этого связывания (кривые, идентичные представлены на рис. 3, были получены при использовании в качестве тест-антигена клеток человека, мыши и крысы). С другой стороны, при разделении моноклеарных клеток на субпопуляции (рис. 4) обнаруживались отчетливые различия в связывании МКА ИФБ-4.

Так, удаление прилипающих клеток (моноцитов, макрофагов) с помощью инкубации на полистироле несколько снижало интенсивность связывания ИФБ-4. Связывания вовсе не наблюдалось, если из популяции тест-клеток путем инкубации на полистироле, покрытом антииммуноглобулиновыми антителами, удалялись клетки, экспрессирующие поверхностные иммуноглобулины. Не отмечалось также специфического связывания МКА ИФБ-4 с клетками мышиной плазмцитомы двух линий МОРС-2I и X63-Ag8-653.

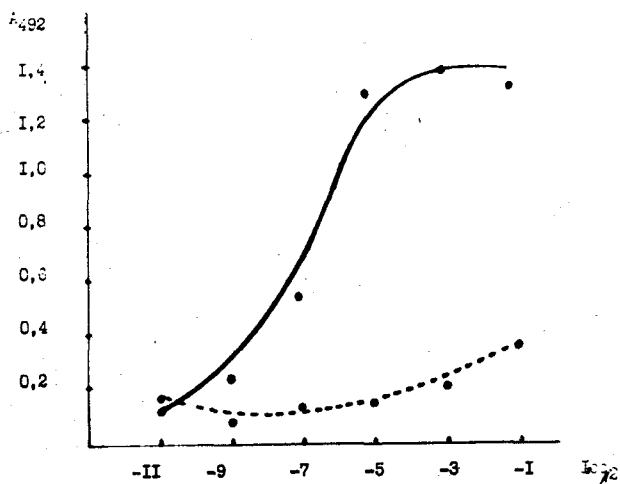


Рис. 1. Связывание МКА ИФБ-4 с эпитопами плазматической мембраны клеток головного мозга.

Мембранную фракцию ткани головного мозга быка выделяли центрифугированием в градиенте плотности сахарозы и сорбировали на лунки микрокамер (1 мкл/лунку). Затем ставили тест ELISA: тест-антиген инкубировали с надосадочными жидкостями гибридом, затем добавляли антимышьиные антитела, меченные пероксидазой хрена (Calbiochem, 1:1000). О связывании судили по разложению пероксида водорода в присутствии ортофенилендиамина. Фотометрию производили с помощью прибора "Морфоквант" [2]. По оси абсцисс - логарифм разведения надосадочной жидкости гибридомы, по оси ординат - экстинкция при 492 нм с поправкой на фоновое связывание. Сплошная линия - результат тестирования надосадочной жидкости гибридомы ИФБ-4, пунктир - контроль (надосадочная жидкость гибридомы, продуцирующей МКА посторонней специфичности). Аналогичные результаты были получены при использовании в качестве тест-антигена клеток нейробластомы.

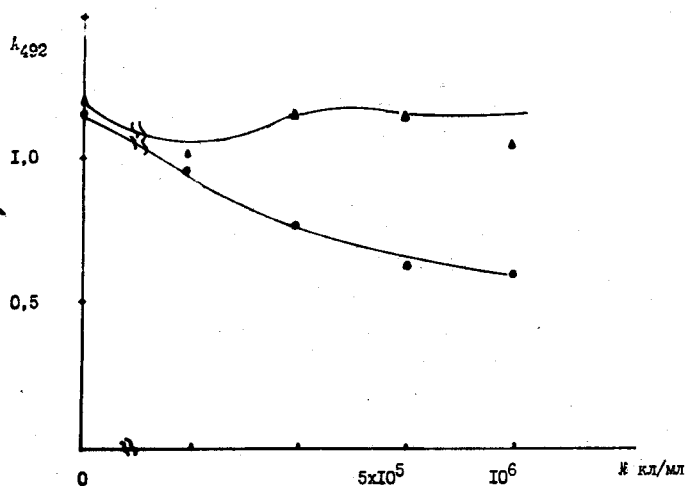


Рис. 2. Адсорбция МКА ИФБ-4 монослоем клеток нейробластомы и ее блокада, индуцируемая вератрином.

Надосадочную жидкость гибридомы инкубировали с монослоем интактных жизнеспособных клеток мышинной нейробластомы (линия N18, клон TG2A1) в плоскодонных планшетах (Flow) при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем отбирали пробу надосадочной жидкости и оценивали остаточное содержание МКА, используя в качестве тест-антигена клетки нейробластомы, фиксированные глутаральдегидом на дне микрокамер. Ось абсцисс - концентрация клеток в адсорбирующем монослое (логарифмическая шкала с основанием 2). Ось ординат - экстинкция при 492 нм с поправкой на фоновое связывание. Кружки - адсорбция монослоем в отсутствие вератрина, треугольники - в пробах с монослоем адсорбирующих клеток присутствует вератрин (500 мкг/мл). В последующих опытах было показано, что: а) эффект вератрина дозозависим (полумаксимальное угнетение адсорбции вызывается присутствием в тест-системе вератрина в концентрации 1-2 мкг/мл); б) другие лиганды, специфичные для натриевого канала - тетродотоксин и токсин скорпиона - не вызывают достоверного угнетения адсорбции; в) адсорбция клетками нейробластомы МКА, связывающих не-ИФБ-4-эпитоп, не блокируется вератрином[4].

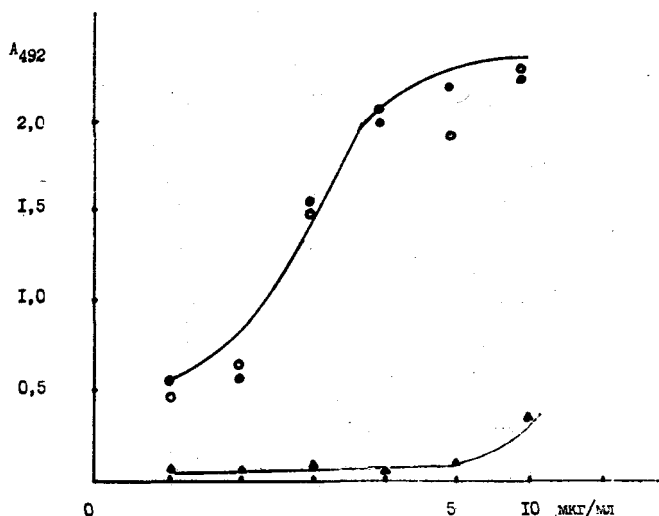


Рис. 3. Связывание МКА ИФБ-4 с мононуклеарными клетками (МНК) периферической крови человека.

МНК выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина и сорбировали в лунки микрокамер (2×10^4 клеток/лунку). В тесте ELISA (см. подпись к рис. 1) источником МКА служили иммуноглобулиновые фракции супернатанта гибридомы, асцитной жидкости или сыворотки крови (их получали с помощью высаливания полунасыщенным раствором сульфата аммония и последующим диализом против изотонического раствора). Ось абсцисс - концентрация белка иммуноглобулиновой фракции (логарифмическая шкала по основанию 2). Ось ординат - см. подпись к рис. 1. Светлые кружки - МКА ИФБ-4, темные кружки - референс-положительные МКА В2 (см. [1]), треугольники - иммуноглобулины сыворотки крови intactных мышей.

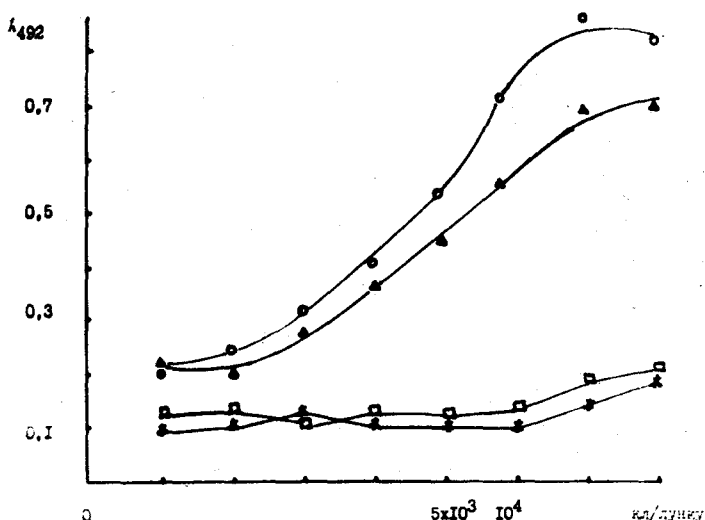


Рис. 4. Связывание МКА ИФБ-4 (1 мкг/мл) с мононуклеарными клетками мышей линии СВА.

Ось абсцисс - число клеток на лунку (логарифмическая шкала с основанием 2). Ось ординат - см. подпись к рис. 1. 1 - МНК, 2 - МНК после удаления прилипающих клеток, 3 - МНК после удаления клеток, экспрессирующих поверхностные иммуноглобулины, 4 - связывание с МНК иммуноглобулинов сыворотки крови интактных мышей (1 мкг/мл).

Принимая во внимание, что некоторые МКА к белкам, представленным на мембранах клеток мозга и лимфоцитов (в частности, МКА к Thy-1 -антигену) индуцируют у последних пролиферативный ответ, мы изучили влияние МКА ИФБ-4 на пролиферацию мононуклеарных клеток. Оказалось, что ИФБ-4 индуцируют отчетливый пролиферативный ответ мононуклеарных клеток человека и млекопитающих (рис. 5). Удаление прилипающих клеток не влияло на величину данного ответа, в то время как при удалении клеток, экспрессирующих поверхностные иммуноглобулины, данный ответ отсутствовал (рис. 6).

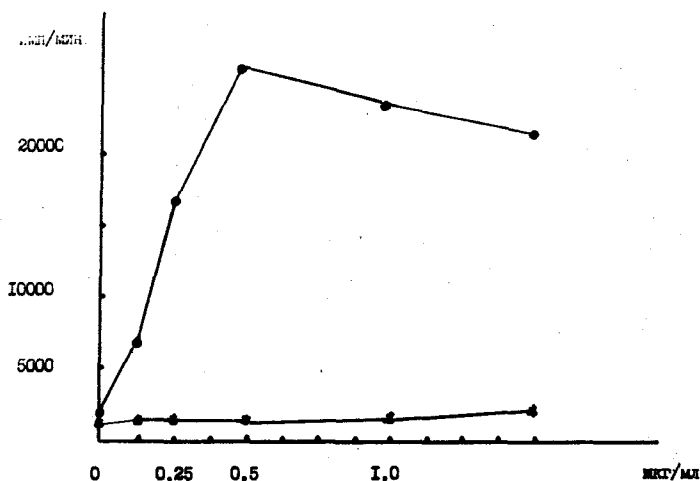


Рис. 5. Влияние МКА ИФБ-4 на пролиферацию МНК мышей линии СВА.

МНК культивировали в присутствии различных концентраций МКА ИФБ-4 или иммуноглобулинов сыворотки крови интактных мышей (линии ВАВ/с). Пролиферативную активность клеток оценивали по включению ^3H -тимидина с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика "Rack Beta" (ЛКВ). Ось абсцисс — конечная концентрация белка иммуноглобулиновой фракции в пробах. Ось ординат — число импульсов в 1 мин. 1 — МКА ИФБ-4, 2 — иммуноглобулины сыворотки крови интактных мышей.

Поскольку в нашей работе в качестве МКА ИФБ-4 использовались нативные иммуноглобулины, нельзя было исключить, что и в связывание, и в митогенный эффект МКА определенный вклад вносят F_c -фрагменты иммуноглобулинов [6]. Однако представленные выше результаты легче всего объяснить, если предположить, что эпитоп ИФБ-4 избирательно экспрессируется В-лимфоцитами, которые и являются мишенью митогенного эффекта МКА. Механизм митогенного эффекта МКА ИФБ-4 подлежит дальнейшему изучению. Можно представить, что ИФБ-4, подобно антителам к поверхностному иммуноглобулину, индуцируют в В-клетках $\text{G}_0\text{-G}_1$ переход,

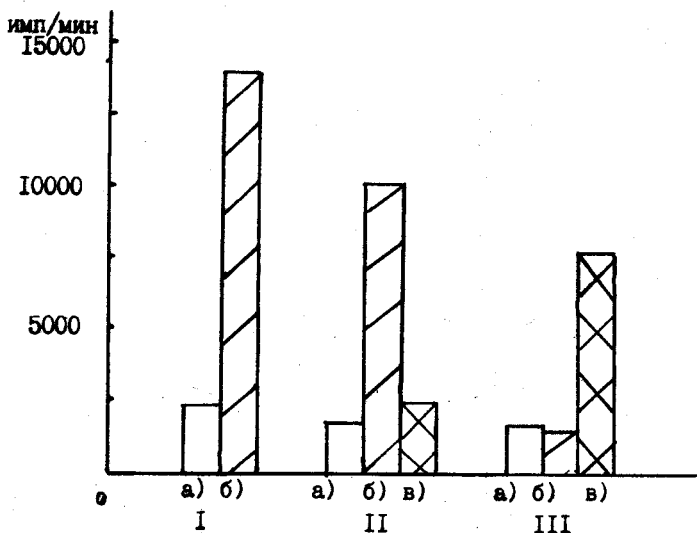


Рис. 6. Влияние удаления прилипающих клеток и клеток, экспрессирующих поверхностные иммуноглобулины, на митогенное действие МКА ИФБ-4.

По вертикальной оси - число импульсов в 1 мин (см. также подпись к рис. 5). I - МНК, II - МНК после удаления прилипающих клеток, III - МНК после удаления клеток, экспрессирующих поверхностные иммуноглобулины. Включение ^3H -тимидина: в тестируемые популяции в присутствии: а) среды; б) антител ИФБ-4 (0,5 мкг/мл); в) фитогемагглютинаина (1 мкг/мл).

что обеспечивает дальнейшее вступление клеток в S-фазу клеточного цикла и митоз при условии получения "второго сигнала" от Т-лимфоцитов [9]. Возможно, причиной такого действия МКА ИФБ-4 на В-лимфоциты является физическая либо функциональная связь молекулы, несущей эпитоп ИФБ-4, с поверхностным иммуноглобулином. Заслуживает внимания, что недавно электрофизиологическими исследованиями (метод "patch-clamp") доказано существование в мембране В-лимфоцитов электроуправляемых натриевых каналов, активность которых ассоциирована с перекрестным связы-

ванием поверхностных иммуноглобулинов [7].

ЛИТЕРАТУРА

1. Волгин А.Ю., Пинчук Г.В., Черников и др. // Моноклональные антитела в микробиологии и вирусологии. - М.: Медицина, 1985. - С. 166-174.
2. Клеринг П.Г., Пинчук Г.В., Аксенова С.А. и др. // Математическое обеспечение и программно-технические средства для моделирования развивающихся систем. Материалы семинара. Славское, 12-17 марта 1986 г. - Киев, 1987. - С. 144-147. (Рукопись депонир. ВИНТИ 09.02.1987, № 944-В87 ДНП).
3. Малышева М.К., Липко В.К., Жукарева В.А. и др. // Нейрофизиология. - 1987. - Т. 19. - № 2. - С. 202-209.
4. Пинчук Г.В., Пинчук Л.Н., Герасименко О.В. и др. // Нейрофизиология. - 1988. - Т. 20. - № 6. (в печати).
5. Köhler G., Milstein C. // Nature. - 1975. - V. 256. - No. 5023. - P. 592-595.
6. Metzger H., Kinet J.P. // FASEB J. - 1988. - V. 2. - No. 1. - P. 3-12.
7. McCann F.V., Keller T.M., Noelle R.J. // J. Gen. Physiol. - 1987. - V. 90. - No. 6. - P. 29a.
8. Pateraki E., Guesdon J.L., Serie C. et al. // J. Immunol. Meth. - 1981. - V. 46. - No. 3. - P. 361-368.
9. Zubler R.N., Werner-Favre C., Wen L. et al. // Immunol. Rev. - 1987. - V. 99. - P. 281-299.

ИПО-3 и ИПО-10 - НОВЫЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА, ВЫЯВЛЯЮЩИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВочНЫЕ АНТИГЕНЫ В-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

С.П.Сидоренко, Е.П.Ветрова, А.Г.Бердова,
Л.Н.Шлапацкая, А.М.Еленская

Институт проблем онкологии им. Р.Е.Кавецкого АН УССР,
г. Киев

В последние годы получен ряд гибридом, секретирующих моноклональные антитела (МКА) к поверхностным антигенам В-лимфоцитов человека. Часть из них, такие как ВА-1, ВА-2 и ВА-3,

не являются В-специфическими и взаимодействуют также с антигенами на поверхности гранулоцитов, эритробластов и тимокитов [1,2,3]. Другие же (В1, В2, В4, В1-2, НВ-1 и др.) выявляют антигены, присутствующие на В-лимфоцитах, циркулирующих в периферической крови как в норме, так и при злокачественных лимфопролиферативных заболеваниях, в костном мозге и лимфатических узлах, т.е. присутствуют на различных стадиях дифференцировки от пре-В-клеток до плазмобластов [4,5,6].

Целью настоящей работы является получение МКА к дифференцировочным антигенам В-клеток, необходимых для классификации и диагностики В-клеточных форм злокачественных лимфопролиферативных заболеваний: хронического лимфолейкоза, пре-В и В-клеточного острого лимфобластного лейкоза, миеломной болезни, неходжкинских злокачественных лимфом и лимфогранулематоза, клеточным субстратом которых в большинстве случаев являются В-клетки на различных этапах бластной трансформации.

Гибридомы, секретирующие МКА ИПО-3 и ИПО-10, были получены при соматической гибридизации клеток мышинной миеломы P3-X63-Ag8.653 и клеток селезенки мышей, иммунизированных соответственно клетками линий RPMI-1788 и Daudi.

После селекции гибридов в НАТ- и НТ-среде проведено клонирование и реклонирование гибридом методом лимитирующих разведений. Скрининг антительной активности проводили непрямым иммунофлуоресцентным методом на монослое живых клеток. Получены две стабильные линии гибридом, продуцирующих МКА, обозначаемые ИПО-3 и ИПО-10. С помощью этих МКА, параллельно с панелью из 60 МКА против различных антигенов лимфоцитов человека, исследованы клетки 12 линий клеток человека, мононуклеары крови и лимфоидных органов 112 больных с различными формами злокачественных лимфопролиферативных заболеваний и 49 здоровых лиц.

Результаты исследований специфичности МКА ИПО-3 и ИПО-10 на линиях клеток представлены в табл. I, откуда следует, что МКА ИПО-3 реагирует с антигенами поверхностных мембран В-клеточных линий, за исключением клеток линии Ramos, RPMI-8226, и не взаимодействуют с различными по уровню дифференцировки клеток линиями Т-клеточного происхождения и клетками линии K-562. Они не реагируют с мононуклеарами и гранулоцитами пе-

Таблица I

Взаимодействие МКА ИПО-3 и ИПО-10 с антигенами поверхностных мембран культивируемых клеток человека
(% реагирующих клеток)

Объект исследования	ИПО-3	ИПО-10
В-клеточные линии		
RPMI-1788	51,2	0
PHS	43,8	20,0
EB-3	15,0	31,0
Daudi	66,7	95,0
Namalva	24,0	82,0
Raji	34,0	27,0
Ramos	0	0
Миеломная линия клеток		
RPMI-8226	0	50,0
T-клеточные линии		
MOLT-4	0	0
CCRF-HSB 2	0	0
Jurkat	0	0
Ни T-, ни B-клеточная линия		
K-562	0	0

риферической крови и клетками костного мозга. Антиген, выявляемый МКА ИПО-3, экспрессируется на лимфоцитах крови, активированных митогенами, и на антигенно стимулированных лимфоидных клетках миндалин. В культурах лимфоцитов периферической крови, стимулированных ФГА и Con A, относительное содержание клеток, несущих антиген, выявляемый МКА ИПО-3, было невелико. После стимуляции LPS и PWM уже через 18 часов отмечалось существенное возрастание антиген-положительных клеток до 23,5% и 17,6%, соответственно, а на 4 и 6 сутки число реагирующих клеток снижалось.

Клетки, несущие антиген, выявляемый МКА ИПО-3, обнаружены и при злокачественных лимфопролиферативных заболеваниях. Относительное содержание их значительно варьировало и в ряде

случаев не превышало показатели, наблюдаемые у здоровых лиц. Только в единичных случаях у больных с В-клеточными вариантами хронического лимфолейкоза, острого лимфобластного лейкоза и миеломной болезни число антиген-положительных клеток достигало 5,0-16,5 %. При лимфогранулематозе в 5 пораженных лимфатических узлах отмечено высокое содержание клеток, несущих этот антиген (18,0-73,0 %).

МКА ИПО-10 реагирует с поверхностными антигенами клеток, содержащих в геноме вирус Эпштейна-Барр (линии клеток Daudi, Namalva, Raji, EB-3) и не реагирует с клетками линии Ramos, не имеющими генома вируса Эпштейна-Барр. Антиген, выявляемый МКА ИПО-10, экспрессирован на 20 % клеток В-лимфобластической линии RNS и не выявляется на клетках линии RPMI-1788. Отсутствует он и на поверхностных мембранах клеток линий Т-лимфоцитарного происхождения и клетках линии K-562.

У практически здоровых людей с МКА ИПО-10 реагируют 11,5-29,4 % мононуклеаров периферической крови, 32-65 % клеток миндалины, часть кроветворных клеток костного мозга и эмбриональной печени. Отрицательную реакцию с МКА ИПО-10 дают гранулоциты крови, клетки тимуса, стромальные фибробласты костного мозга.

После стимуляции Т- и В-клеточными митогенами лимфоцитов периферической крови средние показатели числа клеток, реагирующих с МКА ИПО-10, существенно не изменились. В то же время в культурах с LPS и PWM через 18-48 часов число антиген-положительных клеток существенно снижалось, нередко достигая нуля, а на конечных сроках культивирования - восстанавливалось.

Клетки с антигеном поверхностных мембран, реагирующим с МКА ИПО-10, обнаруживаются в крови при ряде форм злокачественных лимфопролиферативных заболеваний - хроническом лимфолейкозе, волосатоклеточном лейкозе, миеломной болезни. Частота обнаружения подобных клеток высока в лимфатических узлах при неходжкинских злокачественных лимфомах и лимфогранулематозе. При остром лимфобластном лейкозе у детей высокое содержание ИПО-10⁺ бластов отмечалось преимущественно при пре-В-клеточном варианте.

Анализ результатов проведенных исследований позволяет прийти к заключению, что антиген, выявляемый МКА ИПО-3, ха-

Таблица 2

Взаимодействие МКА ИПО-3 и ИПО-10 с кроветворными клетками в норме и при лимфопролиферативных заболеваниях

Объект исследования	Моноклональные антитела	
	ИПО-10	ИПО-3
Клетки крови и кроветворных органов здоровых людей		
мононуклеары крови	9/9*	0/12
	II, 5-29,4 **	0
гранулоциты крови	0/3	0/7
	0	0
кроветворные клетки костного мозга	2/2	0/2
	25,0-40,3	0
стромальные фибробласты костного мозга	0/2	0/2
	0	0
тимocyты	0/3	-
	I, 0-2,5	
кроветворные клетки эмбриональной печени	3/5	0/5
	5,6-15,7	0
Клетки миндалин при хроническом тонзиллите	5/5	4/10
	32,0-65,0	8-10,0
Клетки крови больных инфекционным мононуклеозом	2/2	0/2
	4,1-5,6	1,5-3,9
Клетки крови больных хроническим лимфолейкозом	10/14	1/23
	78,4-100,0	5,2
волосатоклеточным лейкозом	1/1	3/3
	76,0	31,0-48,0
острым лимфобластным лейкозом	8/10	7/23
	7,0-82,0	5,7-10,0
острым миеломонобластным лейкозом	0/1	0/1
	0	0
миеломной болезнью	3/6	0/9
	4,0-10,0	0
Клетки лимфатических узлов больных лимфогранулематозом	13/17	9/17
	18,0-92,0	5,0-49,0
неходжкинскими злокачественными лимфомами	3/3	0/3
	18,0-78,0	0-3,0

* Количество положительно реагирующих случаев к общему количеству наблюдений.

** Минимальное и максимальное содержание антиген-положительных клеток (в %).

рактарен для бластных форм В-лимфоцитов, находящихся на антигензависимой стадии дифференцировки В-клеток: от незрелых В-клеток в костном мозге до иммунобластов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abramson C., Kerney J. // J. Immunol. - 1981. - V. 126. - P. 83-88.
2. Bernard A., Boumsell L. // Leucocyte Typing. - Springer-Verlag, 1984. - P. 9-144.
3. Foon K., Todd R. // Blood. - 1986. - V. 68. - No. 1. - P. 1-31.
4. Forsgren A., Penta A., Schlossman S. et al. // Leucocyte Typing, III. - Oxford, 1987. - P. 396-399.
5. Nadler L. // Leucocyte Typing, II. - Springer-Verlag, 1986. - P. 3-47.
6. Nadler L., Stashenko P., Hardy R. // J. Immunol. - 1981. - V. 126. - No. 5. - P. 1941-1947.

ПРОБЛЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОЛОСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА Н-У

Р.В.Сикут, М.Г.Вийкмаа, А.-В.Н.Микельсаар, А.Н.Пихлак*
НИИ общей и молекулярной патологии Тартуского государственного университета, *Институт химической и биологической физики АН ЭССР, Таллинн

Антиген Н-У (АГ Н-У) был открыт в 1955 году как полоспецифический клеточный антиген [2]. Несмотря на длительные усилия многих авторов остается множество проблем, которые можно разделить на следующие группы:

- молекулярная и биохимическая характеристика АГ Н-У;
- локализация структурного гена АГ Н-У и регуляция его экспрессии;
- экспрессия АГ Н-У на разных типах клеток и в разных тканях.

По представлению многих авторов, АГ Н-У функционирует у млекопитающих как эмбриональный индуктор дифференцировки тес-

тикул [5,6]. Однако, чтобы доказать правильность этого положения, требуется решение перечисленных выше проблем. Для более детальной молекулярно-иммунологической характеристики предполагаемого АГ Н-У мы решили использовать моноклональные антитела (МКА).

Для получения МКА к АГ Н-У мы использовали самок мышей С57BL/6, иммунизированных тимоцитами от сингенных самцов. Клетки селезенки иммунизированной мыши сливали с клетками миеломы РА1 при помощи 50 % ПЭГ (Merck). Отбор клонов гибридом проводили методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа на сперматозоидах быка и с помощью твердофазного иммуоферментного анализа на супернатанте клеточной линии Daudi. В результате получены 3 клона, основные свойства антител (класса IgM) которых приведены в таблице I.

Таблица I

Реакция моноклональных антител
с различными источниками антигена Н-У

Источники	Название клона гибридом		
	11F7	1E3	10E11
Растворимый АГ Н-У			
супернатант клеток Daudi	+	+	-
супернатант тестикулярных клеток крысы	+	+	-
Клеточный АГ Н-У			
сперматозоиды быка	+	+	+
сперматозоиды человека	+	+	+
клетки Raji	+	+	-
Н-У негативные клетки			
клетки K-562	-	-	-

Как следует из результатов иммунофлуоресцентного анализа на сперматозоидах быка (рис. I), моноклональные антитела 11F7, 1E3 и 10E11 распознают антигены, имеющие разную локализацию на сперматозоиде, т.е. дело имеется с разными антигенами. Методом проточной цитометрии нами показано, что антитела 11F7 и

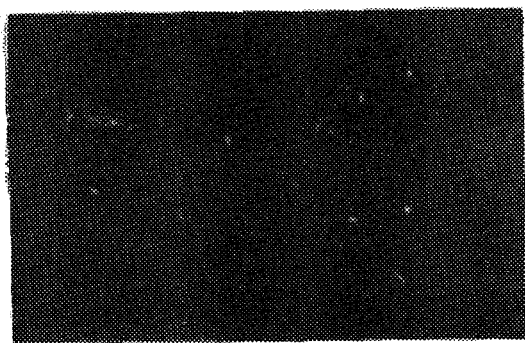
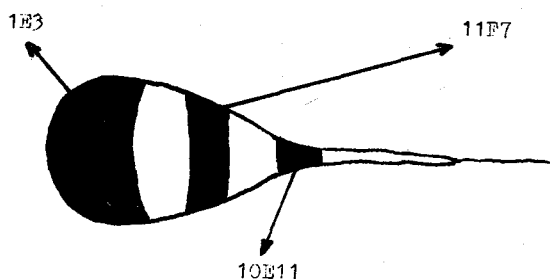
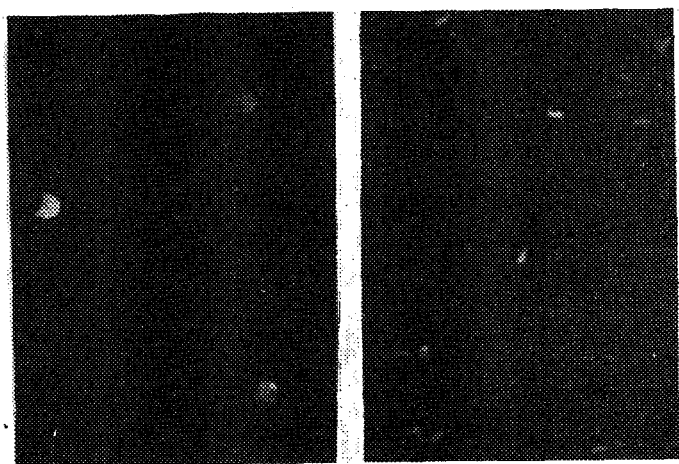


Рис. 1. Локализация на сперматозоидах быка антигенов, распознаваемых моноклональными антителами.

1ЕЗ разделяют сперматозоиды на две популяции, причем клетки, экспрессирующие соответствующий антиген, имеют площадь поперечного сечения несколько меньше, чем клетки, не экспрессирующие антиген (табл. 2). Учитывая факт, что сперматозоиды млекопитающих, содержащие Y-хромосому, немножко меньше по размерам, чем X-сперматозоиды [4], есть основание предполагать, что моноклональные антитела 11F7 и 1ЕЗ реагируют с источниками как растворенного, так и мембран-связанного АГ Н-У, описанными в литературе (табл. 1).

Таблица 2

Свойства субпопуляций сперматозоидов быка, разделяемых моноклональными антителами 1ЕЗ и 11F7

Антитело	Субпопуляция	Доля, %	Инт. флуоресценции	Площадь попер. сеч
1ЕЗ	позитивная	39,95	77,6	34,0
	негативная	60,05	13,3	38,1
11F7	позитивная	58,21	90,2	33,5
	негативная	41,79	21,9	37,3

Данные авторов, исследовавших локализацию АГ Н-У на сперматозоидах, противоречивы. Коо и соавт. [3] показали с помощью антисыворотки локализацию АГ Н-У на акросомальной части сперматозоида мыши (что соответствует реакции нашего антитела 1ЕЗ). Бредли и соавт. [1], тоже с помощью поликлональной антисыворотки, показали локализацию АГ Н-У на задней части головки (что сходно с реакцией нашего антитела 11F7).

На основе литературных и наших собственных данных, мы предполагаем существование двух разных серологически определяемых антигенов, рассматриваемых в работах предыдущих авторов как единый АГ Н-У.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bradley M., Forrester J., Heslop B. // Human Genetics. - 1987. - V. 75. - P. 362-368.
2. Eichwald E.J., Silmser C.R. // Transplant. Bullett. - 1955.

- V. 2. - P. 148-149.
3. Koo G.C., Stackpole C.W., Boyse E.A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1973. - V. 70. - P. 1502-1507.
 4. Mohri H., Oshio S., Kaneko S. // Progress in Developmental Biology. - 1986. - Part A. - P. 179-182.
 5. Ohno S. // Major Sex-Determining Genes. - Berlin: Springer Verlag, 1979. - P. 140.
 6. Wachtel S.S. // H-Y antigen and the biology of sex determination. - New York: Grune & Stratton, 1983. - P. 302.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ЭРИТРОЦИТАРНОМУ АНТИГЕНУ A₂
ГРУПП КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (*Bos taurus*)

А.П.Супрун, Е.В.Березкина, Т.Н.Игнатова, О.В.Милованов,
В.П.Павличенко, А.Г.Паньшин, Т.М.Гринчук, Ю.Т.Паньшина,
З.В.Ковалева

ВНИИ разведения и генетики сельскохозяйственных животных,
Ленинград-Пушкин; Институт цитологии АН СССР,
Ленинград

Использование гибридной технологии, разработанной Келером и Милстейном [1] в 1975 году, позволило в сельскохозяйственной практике разработать новый метод получения реагентов для определения групп крови у крупного рогатого скота, который не требует высокой степени очистки используемых для иммунизации антигенов и позволяет получать неограниченные количества гомогенных высокоспецифических антител.

В 1986 году [2] английские и французские ученые на базе Института физиологии животных (Кембридж, Англия), лаборатории биохимической генетики и Исследовательской станции вирусологии и иммунологии (Тивервиль-Криньон, Франция) впервые получили этим методом несколько гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКА) к группоспецифическим антигенам эритроцитов крупного рогатого скота. Большинство гибридом оказались нестабильными и утратили в процессе культивирования способность синтезировать антитела.

Однако, четыре стабильные гибридомы, специфичные к анти-

генам И, V_2 , Z и A_2 , были использованы для получения реагентов, необходимых в сельскохозяйственной практике.

За основу получения МКА к эритроцитарным антигенам системы групп крови крупного рогатого скота нами была взята методика этих исследователей. Но мы столкнулись с некоторыми трудностями в работе, как: подбор донора для иммунизации, схема иммунизации, скринирование первичных клонов, подбор состава культуральной среды.

Полученная гибридома $4C_7$, продуцирующая МКА к эритроцитарному антигену $V F-V$ системы групп крови у крупного рогатого скота показала, что разработанная нами оригинальная схема иммунизации мышей линии $BALB/c$ и является оптимальной для наших исследований.

В результате слияния спленоцитов мышей линии $BALB/c$, иммунизированных эритроцитами крови крупного рогатого скота с клетками мышиной миеломы $Sp2/0 - Aq14$ с последующей селекцией на среде HAT получено два стабильных клона - продуцента МКА к эритроцитарному антигену A_2 А-системы групп крови крупного рогатого скота. Определен класс иммуноглобулинов МКА, продуцируемых гибридным клоном $6B_6-IgG$.

При проверке МКА на специфичность методом прямого гемолиза эритроцитов животных с известной структурой генотипа по антигенам групп крови крупного рогатого скота обнаружено, что они распознают группоспецифичный антиген эритроцитарной поверхности A_2 . Титр МКА в культуральной среде $1:2 \times 10^3$, в асцитной - $1:10^6$.

Проведен кариологический анализ полученных постоянных гибридных линий.

Полученный реагент прошел испытание на Ленинградском головном племпредприятии на поголовьи из 100 животных с положительной оценкой.

На гибридоме $6B_6$, продуцирующей МКА к эритроцитарному антигену A_2 А-системы групп крови крупного рогатого скота оформлена заявка на изобретение (№ 4412756/13 от 15.04.1988 г. приоритетной справки).

Повторное слияние с использованием спленоцитов мышей линии $BALB/c$, иммунизированных эритроцитами, содержащими A_2 и другие антигены, показало, что антиген A_2 обладает наибольшей

иммуногенностью. Четыре клона, синтезирующие группоспецифические МКА, полученные в этом слиянии, синтезировали МКА только к этому антигену групп крови крупного рогатого скота.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что возможно биотехнологическое получение антигенов разной специфичности, используемых для типирования крупного рогатого скота по группам крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Köhler G., Milstein C. // Nature (Z). - 1975. - V. 256. - P. 495-497.
2. Tucker E.M., Metenier Z., Grosclaude J., Clarke W., Kilgour Z. // Animal Genetics. - 1986. - V. 17. - P. 3-13.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГИБРИДОМЫ И МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА I	3
Н.Ф.Стародуб, Л.И.Коломиец, С.А.Бобровник, В.И.Назаренко. Пути повышения чувствительности твердофазного имму- нохимического анализа и их реализация	3
Л.Н.Падюков, В.А.Таранов. Агглютинационные методы в им- мунодиагностике инфекционных заболеваний	15
М.Г.Вийкмаа, А.-В.Н.Микельсаар, Э.И.Юронен. Компьютер- ный анализ данных иммуоферментной характеристики моноклональных антител	23
У.В.Арумян. Новый метод количественного определения фак- торов роста нервов	32
И.И.Бабиченко. Иммуногистохимическое выявление рецепто- ров к инсулино-подобному ростовому фактору-I с по- мощью антител к различным участкам молекулы инсули- нового рецептора	36
М.М.Белова, Е.Ю.Котляр, Н.Л.Зоткина, Н.Г.Хамидуллина, Е.В.Короткова, Л.Я.Махмутова, В.Г.Винтер. Получе- ние и характеристика моноклональных антител к Мп- зависимой ДНКазе хроматина печени крыс	42
Н.Р.Берман, В.И.Баранов, С.А.Розенфельд, Г.А.Кирбенов, В.П.Патерило. Приборы и устройства гаметно-клеточ- ной селекции	48
А.Э.Валдманн, А.-В.Н.Микельсаар. Характеристика моно- клональных антител к прогестерону	54
Я.С.-В.Казесалу, К.К.Мёллер, С.Ю.Халдре, А.О.Пийрсоо. Твердофазный "сэндвич" иммуоферментный анализ ней- роспецифической эналазы спинномозговой жидкости с применением моноклональных антител	58
Л.В.Кухарева, И.А.Дьяконов, М.И.Блинова, Н.С.Николаенко, Г.П.Пинаев. Продуцирование моноклональных антител к α_2 -интерферону человека иммобилизованными клетками гибридомы	63

Р.А.-В.Микельсаар, А.-В.Н.Микельсаар. Получение моноклональных антител к 17 α -гидроксипрогестерону	68
И.Ю.Павлов, Л.Ф.Арапова, И.Н.Блинова, А.М.Пивоваров, Л.С.Изотова, А.Я.Стронгин, Ю.Я.Бундулис, В.В.Берзинь, Л.П.Коробицын. Панель моноклональных антител к человеческим α -интерферонам	71
Н.Д.Перумов, А.С.Симбирцев, А.А.Колобов, А.Н.Полторах, Н.М.Калинина, Н.И.Колодкин, С.А.Кетлинский, О.А.Кауров. Использование антител к синтетическим фрагментам интерлейкинов I и 2 человека для их очистки и характеристики	75
А.М.Пивоваров, А.В.Трофимов, Л.Ф.Арапова, С.А.Синева, И.А.Блинова, Л.П.Коробицын. Моноклональные антитела, распознающие типы и изотипы иммуноглобулинов человека. Вопросы стратегии подготовки антигенов и получения гибридом	80
М.Л.Тедер. Об идентификации специфического белка муковисцидоза при помощи моноклональных антител	88
Л.А.Селезнева, Е.А.Перфильева, С.Н.Курочкин. Получение моноклональных антител к простагландинам серии Е	93
О.А.Сердюк, Р.Г.Василов. Иммуноферментная тест-система на основе моноклональных антител для определения общего уровня иммуноглобулина Е у детей и подростков	96
Р.В.Сикут, А.-В.Н.Микельсаар. Моноклональные антитела к тиреоидным гормонам Т3 и Т4	101
Е.Я.Смирнова, Р.Г.Василов. Получение протеолитических фрагментов молекулы IgE человека и их использование для выявления специфичности моноклональных антител	105
В.В.Смолянинов, А.П.Калужная, Г.В.Шехватова, М.И.Болезнин. Скрининг клонов <i>E.coli</i> на содержание РНКазы Н методом иммуноферментного анализа	112
В.В.Смолянинов, А.П.Калужная, Г.В.Шехватова, Л.Н.Гусева. Использование моноклональных антител для обнаружения терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы (тат) в сыворотке крови	113

Б.Г.Торопова, А.В.Глебов, Э.И.Юронен. Моноклональные антитела к миоглобину в мониторинге больных с нарушением кровоснабжения конечностей	II4
А.В.Трофимов, С.А.Синева, А.М.Пивоваров, И.А.Блинова, С.В.Андреев, А.М.Ищенко, Л.А.Кузьмина, Л.Я.Соловьева, Е.А.Карабанова, Т.О.Антипова, Л.П.Коробицын. Получение гибридом с помощью сложных антигенных композиций	II8
М.М.Уускула; Э.И.Юронен, К.М.Ламп, М.Х.Пааво. Сравнительные результаты использования наборов для определения миоглобина на основе моно- и поликлональных антител в диагностике инфаркта миокарда	I25
Э.И.Юронен, А.-В.Н.Микельсаар, М.Г.Вийкмаа, Ю.Р.Сийгур. Моноклональные антитела к топографическим и секвенциальным эпитопам миоглобина человека	I29
М.Н.Чернова, С.Ф.Мирзоева, С.М.Драницына, Е.А.Сурина. Использование моноклональных антител для выделения аденилатциклазы	I37
О.М.Цыганкова, Л.А.Третьяков, Е.В.Гришин. Белок из мозга быка, проявляющий антигенные свойства α -латротоксина	I42
ГИБРИДОМЫ И МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА II	I48
М.Ю.Саарма, Л.В.Ярвекулъг, Л.В.Андреева, М.М.Оямаа, Р.К.Синиярв. Применение иммунофлуориметрии временного разрешения для одновременного количественного определения вирусов	I48
У.В.Барсов, А.Н.Полторак, М.И.Букринский, В.А.Пасечник, Г.Ф.Пучкова, Е.А.Полякова, И.А.Костарева. Использование рекомбинантного полипептида, содержащего антигенные детерминанты белка р24 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), в диагностике СПИД	I57
М.В.Андросова, И.Н.Трахт, М.А.Владимирский. Моноклональные антитела с избирательной специфичностью к микобактериям туберкулеза человеческого вида и вакцинного штамма VCG	I6I

Т.Н.Плечко, А.В.Кириллов. Моноклональные антитела против фитовирусов	167
Е.А.Полякова, С.А.Синева, О.И.Иващук, А.В.Трофимов, А.Н. Полторак, Л.П.Коробицын. Иммуноаффинная хроматогра- фия препаратов вируса гриппа на моноклональных ан- тителах к структурным компонентам вириона	174
И.А.Разумов, Е.В.Протопопова, А.В.Перебоев, В.Б.Локтев. Использование моноклональных антител для типирования и обнаружения антигенов вируса клещевого энцефалита	176
С.А.Синева, А.В.Трофимов, Е.А.Полякова, О.И.Иващук, А.Н. Полторак, Л.П.Коробицын. Получение гибридом, проду- цирующих моноклональные антитела к структурным бел- кам вируса гриппа	180
ГИБРИДОМЫ И МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА III 185	
П.С.Вачурин, Н.А.Маркова, Н.Е.Сурнакова, А.Ю.Кирюхин, А.В.Филатов. Панель моноклональных антител против маркеров лимфоцитов человека и ее использование при оценке иммунного статуса	185
Д.З.Глузман, В.А.Надгорная, И.В.Абраменко, А.И.Евсеева, Л.М.Скляренко, О.В.Юрченко, Л.Ю.Полудненко, Г.В.Пис- нячевская. Иммуноцитохимические методы в диагности- ческих цитологических исследованиях	186
Н.Н.Аксенова, В.А.Плещак, В.А.Иванов, И.В.Кожухарова, И.И.Фирулина, Т.Н.Игнатова, В.Я.Фель. Получение моно- клональных антител к дифференцировочному антигену HNK-I естественных киллеров человека	194
Е.В.Березкина, Т.Н.Игнатова, Т.М.Гринчук, Ю.Т.Паньшина, А.П.Супрун, О.В.Милованов, А.Г.Паньшин, В.П.Павли- ченко. Моноклональные антитела к эритроцитарному ан- тигену v F-v системы крови крупного рогатого скота (<i>Bos taurus</i>)	198
С.А.Вероман, Я.С.-В.Казесалу, С.Ю.Халдре. Экспрессия ней- роспецифических энолазы и креатинкиназы в органно- культивированных хрусталиках плодов	199

А.Ю.Волгин. Стратегия получения и культивирования гибридом, секретирующих моноклональные антитела к клеточным и растворимым антигенам	203
В.С.Горностаев, А.Б.Олимпиева, А.О.Данилов, Б.Г.Торопова, Д.Ф.Нягулов, А.В.Глебов, З.М.Чистякова, В.В.Окулов, П.В.Хролова, Л.П.Папаян. Получение моноклональных антител к фактору VIII свертывания крови человека	206
Е.И.Дерюгина, Н.И.Дризе, Л.Н.Леменева, Е.Ю.Садовникова, И.Л.Чертков. Моноклональные реагенты для определения группоспецифических антигенов эритроцитов человека	209
Е.С.Завольная, А.М.Машуров, З.С.Морозова, Т.П.Швецова, В.И.Черкащенко. Опыт использования криоконсервации спленоцитов при получении моноклональных антител против эритроцитарных антигенных факторов жвачных животных	214
С.О.Ингерпуу, А.Э.Сюнтер, А.О.Пийрсоо, А.Н.Пихлак. Моноклональные антитела к антигенам клеток HL-60 и изменение экспрессии антигенов в ходе дифференцировки	219
Н.Н.Куценко, А.Ю.Волгин, О.Э.Зайкина. Получение моноклональных антител к лимфоцитам крупного рогатого скота и их характеристика	224
В.В.Новиков, М.Н.Трофимова, А.Ю.Барышников, А.В.Червонский. Моноклональные антитела к антигенам клеток иммунной системы и ПАП-набор моноклональный. Характеристика, применение	227
Г.В.Пинчук, Л.Н.Пинчук, О.В.Герасименко, Ю.В.Герасименко. Моноклональные антитела к "тетродотоксинчувствительному белку" головного мозга - новый В-лимфоцитарный митоген?	231
С.П.Сидоренко, Е.П.Петрова, А.Г.Бердова, Л.Н.Шлапацкая, А.М.Еленская. ИПО-3 и ИПО-10 - новые моноклональные антитела, выявляющие дифференцировочные антигены В-клеток человека	239

Р.В.Сикут, М.Г.Вийкмаа, А.-В.Н.Микельсаар, А.Н.Пихлак. Проблемы идентификации полоспецифического анти- гена Н-У	244
А.П.Супрун, Е.В.Березкина, Т.Н.Игнатова, О.В.Милова- нов, В.П.Павличенко, А.Г.Паньшин, Т.М.Гринчук, Ю.Т.Паньшина, З.В.Ковалева. Моноклональные антитела к эритроцитарному антигену A ₂ групп крови крупного рогатого скота (<i>Bos taurus</i>)	248

ГЕННАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В РЕШЕНИИ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ
ПРОБЛЕМ БИОТЕХНОЛОГИИ.

Материалы всесоюзной конференции. Том II.
Тарту-Кяэрику 20-22 сентября 1988 г.

На русском языке.

Тартуский университет.

ЭССР, 202400, г.Тарту, ул.Юликооли, 18.

Ответственный редактор А.-В. Микельсаар.

Подписано к печати 27.03.1989.

МВ 01430.

Формат 60х84/16.

Бумага ротаторная.

Машинопись. Ротапринт.

Учетно-издательских листов 15,82. Печатных листов 16,0.

Тираж 295.

Заказ № 386.

Цена 3 руб. 20 коп.

Типография ТУ, ЭССР, 202400, г.Тарту, ул.Тийги, 78.